

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. August 2005 (04.08.2005)**

**PCT**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/071108 A2**

**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:**

**C12Q 1/68**

**(81) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(21) Internationales Aktenzeichen:**

PCT/EP2005/000751

**(22) Internationales Anmeldedatum:**

26. Januar 2005 (26.01.2005)

**(25) Einreichungssprache:**

Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:**

Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**

10 2004 003 860.0 26. Januar 2004 (26.01.2004) DE



**(71) Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GmbH** [DE/DE]; Löbstedter Strasse 103-105, 07749 Jena (DE).

**(72) Erfinder; und**

**(75) Erfinder/Anmelder** (nur für US): **WAGNER, Gerd** [DE/DE]; Dornburgerstrasse 8, 07743 Jena (DE). **WIEHLMANN, Lutz** [DE/DE]; Günther-Wagner-Allee 9, 30177 Hannover (DE). **TUEMMLER, Burkhard** [DE/DE]; Eisenacher Weg 41, 30179 Hannover (DE).

**(74) Anwalt:** **HUENGES, Martin**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

**(84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**WO 2005/071108 A2**

**(54) Title:** METHOD FOR GENO- AND PATHOTYPING PSEUDOMONAS AERUGINOSA

**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR GENO- UND PATHOTYPISIERUNG VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

**(57) Abstract:** The invention relates to a method for geno- and *pathotyping* *Pseudomonas aeruginosa*-type bacteria by means of hybridisation assays on a biochip or an micro matrix. Specific oligonucleotide probes usable for a detection method and biochips provided therewith are also disclosed.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mittels Hybridisierungstests auf einem Biochip bzw. Microarray. Weiter betrifft die Erfindung spezifische OligonukleotidSonden, die im Rahmen des Nachweisverfahrens eingesetzt werden können, sowie Biochips mit derartigen Oligonukleotid-Sonden.

## Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* mittels Hybridisierungsassays auf einem Biochip bzw. einem Microarray. Weiter betrifft die Erfindung spezifische Oligonukleotid-Sonden, die im Rahmen des Nachweisverfahrens eingesetzt werden können, sowie Biochips mit derartigen Oligonukleotid-Sonden.

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitärer Umweltkeim, der als opportunistisches Pathogen eine hohe Morbidität und Mortalität bei Patienten verursacht, die ein lokal oder systemisch geschwächtes Immunsystem haben. Zusätzlich nimmt *Pseudomonas aeruginosa* durch die chronische Besiedlung der Atemwege von Mukoviszidose-Patienten einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Aufgrund der umfangreichen metabolischen und adaptiven Fähigkeiten von *Pseudomonas aeruginosa* ist die Behandlung einer Infektion oft sehr aufwändig und eine vollständige Elimination des Bakteriums oft nicht möglich.

Es wurde gezeigt, dass 70% der Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* auf Intensivstationen von Erregern verursacht wurden, die bereits vorher, zum Teil sogar mehrfach oder mit mehreren Wochen Abstand, bei anderen Patienten nachgewiesen wurden. Derartige nosokomiale Infektionen bedeuten, neben allen unmittelbaren Konsequenzen für die betroffenen Patienten, einen immensen Kostenaufwand für das Gesundheitssystem. Aufgrund dieser hohen Rate an Übertragungen innerhalb des Klinikumfeldes besteht somit ein Bedarf an der Überwachung auftretender Infektionen sowie an der Vermeidung der Ausbreitung und Persistenz von Erregern im Zuge einer Hygienekontrolle.

Für eine erfolgreiche Infektionsvermeidung ist das Erkennen der Infektionsquellen essentiell, wobei zusätzlich zum Erreger nachweis oft zu klären ist, ob mehrfach isolierte Stämme der selben Spezies einem gemeinsamen Klon entstammen oder

unterschiedlichen Ursprungs sind. Diesbezügliche Untersuchungen werden unter dem Begriff "Erregertypisierung" zusammengefasst.

Eine verlässliche Typisierung von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* ließ sich  
5 bislang nur mittels molekularbiologischer Methoden durchführen, die vergleichs-  
weise kompliziert und teuer sind. So wurden bisher *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate  
mit Hilfe einer Wechselfeldgelektrophorese typisiert und den verschiedenen  
Subgruppen zugeordnet. Dafür wurde die genomische DNA des jeweiligen Stammes  
mit Restriktionsenzymen geschnitten und aufgetrennt. Eine solche Untersuchung  
10 setzt, neben dem Zeitaufwand von mehreren Wochen für jede Analyse, ein hohes  
Maß an Vorkenntnissen voraus und kann nur in wenigen Laboratorien durchgeführt  
werden.

Eine molekularbiologische Routine-Typisierung ist somit aufgrund der entstehenden  
15 Kosten bislang nicht gerechtfertigt. Es besteht somit ein Bedarf an Nachweis-  
verfahren für *Pseudomonas aeruginosa*, die auf kostengünstiger Weise von nicht  
spezialisierten molekularbiologischen Routine-labors durchgeführt werden können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum  
20 spezifischen Nachweis und zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterienstämmen  
der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bereitzustellen, das mit relativ geringem  
technischen Aufwand und kostengünstig durchgeführt werden kann. Eine weitere  
Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Vorrichtung zum spezifischen  
25 Nachweis und zur Geno- und Pathotypisierung von Bakterienstämmen der Spezies  
*Pseudomonas aeruginosa* zur Verfügung zu stellen, die sich durch eine leichte  
Handhabbarkeit sowie durch eine Kompatibilität mit üblicherweise in  
molekularbiologischen Laboratorien verwendeten Geräten wie beispielsweise  
Tischzentrifugen und Pipetten auszeichnet.

Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstände gelöst.

5 Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen definiert.

Die Aufgaben werden erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass ein Biochip bzw. Nukleinsäure-Chip mit Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bereitgestellt wird.

10

Der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip bietet den wesentlichen Vorteil, dass auf diese Weise *Pseudomonas aeruginosa* auf schnelle und einfache Weise in einem diagnostischen Routinelabor innerhalb eines Tages nachgewiesen werden kann.

Insbesondere ermöglicht der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip die Geno- und

15

Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*. Somit können auftretende Infektionen überwacht werden und bei Verdacht auf eine nosokomiale Ausbreitung dieses Erregers umgehend Vorkehrungen getroffen werden, um die Ausbreitung und Persistenz von *Pseudomonas aeruginosa* zu vermeiden.

20

Unter einem Nukleinsäure-Chip wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden bezeichnet. Die vorbestimmten Bereiche auf dem Träger werden im Folgenden auch als Array-Elemente bezeichnet.

25

Die Verwendung eines Nukleinsäure-Chips zum spezifischen Nachweis der *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ermöglicht die Detektion der Wechselwirkungsreaktion zwischen den in der zu untersuchenden Probe vorliegenden Target-Nukleinsäuren und Oligonukleotid-Sonden durch übliche

Verfahren wie beispielsweise durch Fluoreszenzdetektion oder radiochemische Methoden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Anwendung von Absorptionsmessungen erwiesen, da diese besonders kostengünstig durchzuführen sind. Eine derartige Absorptionsmessung kann durch Verwendung einer reaktiven

5 Färbemethode, die an den Oberflächenbereichen stattfindet, an denen eine Wechselwirkungsreaktion stattgefunden hat, wesentlich verbessert und verbilligt werden. Hier hat sich u.a. die Abscheidung von Silber an mit Goldnanokügelchen markierten Targetmolekülen bewährt (siehe DE 100 33 334.6 und WO 02/02810). Zum Nachweis der Silberabscheidung kann ein Gerät verwendet werden, das eine

10 oder mehrere Leuchtdioden beliebiger geeigneter Emissionswellenlänge als Lichtquelle verwendet und beispielsweise eine CCD-Kamera zur ortsaufgelösten Detektion der Wechselwirkungsreaktion auf den vorbestimmten Bereichen des Chips aufweist.

15 Zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung werden u.a. folgende Definitionen verwendet:

Unter einem Mikroarray bzw. Microarray bzw. Sonden-Array wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von molekularen Sonden bzw. einer

20 Substanzbibliothek auf einem Träger verstanden, wobei die Position einer jeden Sonde separat bestimmt ist. Vorzugsweise umfasst der Array definierte Stellen bzw. vorbestimmte Bereiche, so genannte Array-Elemente, die besonders bevorzugt in einem bestimmten Muster angeordnet sind, wobei jedes Array-Element üblicherweise nur eine Spezies an Sonden beinhaltet. Die Anordnung der Moleküle

25 bzw. Sonden auf dem Träger kann dabei durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erzeugt werden. Eine Position innerhalb der Anordnung, d.h. des Arrays, wird üblicherweise als Spot bezeichnet. Der Sonden-Array bildet somit die Detektionsfläche.

Unter einem Array-Element bzw. einem vorbestimmten Bereich bzw. einem Spot wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein für die Deposition einer molekularen Sonde bestimmtes Areal bzw. nach der Deposition mit einer oder 5 mehreren definierten molekularen Sonden belegtes Areal auf einer Oberfläche verstanden, die Summe aller belegten Array-Elemente ist das Sonden-Array bzw. Microarray.

Unter einer Sonde bzw. Oligonukleotid-Sonde wird im Rahmen der vorliegenden 10 Erfindung ein Molekül verstanden, das zum Nachweis anderer Moleküle durch ein bestimmtes, charakteristisches Bindungsverhalten bzw. eine bestimmte Reaktivität verwendet wird. Für die auf dem Array angeordneten Sonden kommt jede Art von Nukleinsäuren und/oder deren Analoga in Frage, die sich an feste Oberflächen koppeln lassen und eine spezifische Affinität aufweisen. Die Oligonukleotide können 15 DNA-Moleküle, RNA-Moleküle und/oder deren Analoga wie z.B. artifizielle bzw. modifizierte Nukleotide umfassen. Beispielsweise kann es sich bei den Oligonukleotid-Sonden um Oligonukleotide mit einer Länge von 10 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 50 Basen und besonders bevorzugt von 20 bis 30 Basen Länge handeln, die auf der Array-Oberfläche immobilisiert sind.

20 Typischerweise handelt es sich erfindungsgemäß bei den Oligonukleotid-Sonden um einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle oder Moleküle von Nukleinsäureanaloga, bevorzugt einzelsträngige DNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, die mindestens über einen Sequenzbereich verfügen, der zu einem Sequenzbereich der Target- 25 Nukleinsäuren komplementär ist. Je nach Nachweisverfahren und Anwendung können die Oligonukleotid-Sonden auf einem festen Trägersubstrat z.B. in Form eines Microarrays immobilisiert sein. Darüber hinaus können sie je nach

Nachweisverfahren radioaktiv oder nicht radioaktiv markiert sein, so dass sie über eine im Stand der Technik übliche Nachweisreaktion nachgewiesen werden können.

Unter einem Target bzw. einer Target-Nukleinsäure wird im Rahmen der  
5 vorliegenden Erfindung insbesondere eine im Genom von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegende Nukleinsäure verstanden, die Hinweise auf die Identität eines in der Probe vorliegenden Stamms der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, von krankheitsassoziierten Genen und/oder auf die Identität des vorliegenden Flagellen-Typs liefert. Die Target-Nukleinsäuren umfassen in der Regel Sequenzen mit einer  
10 Länge von 40 bis 10.000 Basen, bevorzugt von 60 bis 2.000 Basen, ebenfalls bevorzugt von 60 bis 1.000 Basen, insbesondere bevorzugt von 60 bis 500 Basen und am meisten bevorzugt von 60 bis 150 Basen. Ihre Sequenz beinhaltet ggf. die Sequenzen von Primern sowie die durch die Primer definierten Sequenzbereiche des Templates. Bei den Target-Nukleinsäuren kann es sich insbesondere um einzel- oder  
15 doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle handeln, von denen ein oder beide Stränge nach einer erfolgten geeigneten Behandlung, wie sie z.B. im Stand der Technik beschrieben ist, markiert sind, so dass sie in einem der im Stand der Technik üblichen Nachweisverfahren nachgewiesen werden können. Besonders bevorzugt handelt es sich bei Target-Nukleinsäuren um Nukleinsäuren, die in mindestens 30%  
20 der Population von *Pseudomonas aeruginosa* eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz des Genoms des Referenzstamms PAO1 (siehe [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen; um Nukleinsäuren, die in nicht in allen Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* vorkommen; um Nukleinsäuren, die in Pathogenitätsinseln im Genom von  
25 *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen; um Nukleinsäuren, die in krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen; sowie um Nukleinsäuren, die in für Flagellen von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden Genen enthalten sind.

Als Target-Sequenz wird erfindungsgemäß der Sequenzbereich des Targets bezeichnet, der durch Hybridisierung mit der Sonde nachgewiesen wird. Erfindungsgemäß wird auch davon gesprochen, dass dieser Bereich durch die Sonde adressiert wird.

5

Unter einer Substanzbibliothek wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Vielzahl von unterschiedlichen Sondenmolekülen verstanden, vorzugsweise mindestens 2 bis 1.000.000 unterschiedliche Moleküle, besonders bevorzugt mindestens 10 bis 10.000 unterschiedliche Moleküle und am meisten bevorzugt 10 zwischen 50 und 1.000 unterschiedlichen Molekülen. Bei speziellen Ausgestaltungen kann eine Substanzbibliothek auch nur mindestens 50 oder weniger oder mindestens 30.000 unterschiedliche Moleküle umfassen. Die Substanzbibliothek ist vorzugsweise als Array auf einem Träger in der Reaktionskammer der erfindungsgemäßen Vorrichtung angeordnet. Die Anordnung der Substanzen bzw. 15 Sondenmoleküle auf dem Träger erfolgt bevorzugt derart, dass jeder Substanz bzw. jeder Spezies von Sondenmolekülen ein bestimmter, eindeutig zu identifizierender Ort zugeordnet ist und dass jede Substanz bzw. jede Spezies von Sondenmolekülen getrennt von den anderen immobilisiert ist.

20 Unter einem Trägerelement bzw. Träger bzw. Substanzbibliothekenträger wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Festkörper verstanden, auf dem das Sonden-Array aufgebaut ist. Bei dem Träger, der üblicherweise auch als Substrat oder Matrix bezeichnet wird, kann es sich z.B. um Objektträger oder Wafer oder aber auch keramische Materialien handeln. Die Gesamtheit aus in Array-Anordnung auf der 25 Detektionsfläche abgelegten Molekülen bzw. der in Array-Anordnung auf der Detektionsfläche abgelegten Substanzbibliothek und dem Träger wird häufig auch als "Nukleinsäure-Chip", "Chip", "Biochip", "Mikroarray", "Microarray", "DNA-Chip", "Sondenarray" etc. bezeichnet.

Herkömmliche Nukleinsäure-Chips bzw. Arrays bzw. Microarrays im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen etwa 10 bis 5.000, vorzugsweise 20 bis 500 und besonders bevorzugt 50 bis 100 unterschiedliche Spezies von Oligonukleotid-Sonden

5 auf einer, vorzugsweise quadratischen, Fläche von z.B. 1 mm bis 4 mm x 1 mm bis 4 mm, vorzugsweise von 2 mm x 2 mm oder etwa 17,64 mm<sup>2</sup>. In weiteren Ausgestaltungen umfassen Mikroarrays im Rahmen der vorliegenden Erfindung etwa 50 bis etwa 80.000, vorzugsweise etwa 100 bis etwa 65.000, besonders bevorzugt etwa 1.000 bis etwa 10.000 unterschiedliche Spezies von Sondenmolekülen auf einer

10 Fläche von mehreren mm<sup>2</sup> bis mehreren cm<sup>2</sup>, vorzugsweise etwa 1 mm<sup>2</sup> bis 10 cm<sup>2</sup>, besonders bevorzugt etwa 2 mm<sup>2</sup> bis etwa 1 cm<sup>2</sup> und am meisten bevorzugt etwa 4 mm<sup>2</sup> bis etwa 6,25 mm<sup>2</sup>. Beispielsweise weist ein herkömmliches Mikroarray von 100 bis 65.000 unterschiedliche Spezies von Sondenmolekülen auf einer Fläche von etwa 2,4 mm x etwa 2,4 mm auf. Weitere beispielhafte Größen der Flächen des

15 Mikroarrays bzw. der Flächen für die Synthese der Biopolymere sind etwa 1 bis 10 mm x etwa 1 bis 10 mm, vorzugsweise etwa 2,4 bis 5 mm x etwa 2,4 bis 5 mm und besonders bevorzugt etwa 3,5 bis 4,5 mm x etwa 3,5 x 4,5 mm.

Eine Markierung bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine

20 detektierbare Einheit, beispielsweise ein Fluorophor oder eine Ankergruppe, an die eine detektierbare Einheit oder ein die Umsetzung eines löslichen Edukts bzw. Substrats in ein unlösliches Produkt katalysierender Katalysator oder Kristallisationskeim gekoppelt werden kann.

25 Unter einem Edukt bzw. Substrat (im Sinne eines enzymatischen Substrats) wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein im Reaktionsmedium gelöst vorliegendes Molekül bzw. eine Kombination von Molekülen verstanden, das bzw. die mit Hilfe eines Katalysators bzw. eines Kristallisationskeimes und/oder eines umsetzenden

Agens lokal abgeschieden wird. Das umsetzende Agens kann beispielsweise ein reduzierenden Agens wie bei der Silberabscheidung oder ein oxidierendes Agens wie bei der Erzeugung eines Farbstoffs durch enzymatische Oxidation sein.

5 Als Probe bzw. Probenlösung bzw. Analyt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die zu analysierende Flüssigkeit mit den nachzuweisenden und ggf. zu amplifizierenden Targetmolekülen bezeichnet.

Eine Vervielfältigungsreaktion bzw. eine Amplifikationsreaktion umfasst im  
10 Rahmen der vorliegenden Erfindung üblicherweise 10 bis 50 oder mehr Amplifikationszyklen, vorzugsweise etwa 25 bis 45 Zyklen, besonders bevorzugt etwa 40 Zyklen. Eine zyklische Amplifikationsreaktion ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise eine Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).

15 Als Primer wird üblicherweise ein kurzes DNA- oder RNA-Oligonukleotid mit etwa 12 bis 30 Basen bezeichnet, das komplementär zu einem Abschnitt eines größeren DNA- oder RNA-Moleküls ist und über eine freie 3'-OH-Gruppe an seinem 3'-Ende verfügt. Aufgrund dieser freien 3'-OH-Gruppe kann der Primer als Substrat für  
20 beliebige DNA- oder RNA-Polymerasen dienen, die in 5'-3'-Richtung Nukleotide an den Primer synthetisieren. Die Sequenz der neu synthetisierten Nukleotide ist dabei durch die Sequenz des mit dem Primer hybridisierten Templates vorgegeben, die jenseits der freien 3'-OH-Gruppe des Primers liegt. Primer üblicher Länge umfassen zwischen 12 bis 50 Nukleotide, bevorzugt zwischen 15 und 30 Nukleotide.

25 Als Template oder Template-Strang wird üblicherweise ein doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül oder ein Nukleinsäurestrang bezeichnet, der als Vorlage zur Synthese von komplementären Nukleinsäuresträngen dient.

Als Hybridisierung wird die Bildung von doppelsträngigen Nukleinsäuremolekülen oder Duplexmolekülen aus komplementären einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen bezeichnet. Dabei findet die Assoziation vorzugsweise

5 immer zu Paaren von A und T bzw. G und C statt. Eine Assoziation kann vorzugsweise auch über nicht klassische Basenpaarungen wie Wobbelbasenpaarungen z.B. zwischen Inosin und G bzw. Inosin und C erfolgen. Im Rahmen einer Hybridisierung können z.B. DNA-DNA-Duplexes, DNA-RNA- oder RNA-RNA-Duplexes gebildet werden. Durch eine Hybridisierung können auch

10 Duplexes mit Nukleinsäureanaloga gebildet werden, wie z.B. DNA-PNA-Duplexes, RNA-PNA-Duplexes, DNA-LNA-Duplexes und RNA-LNA-Duplexes. Hybridisierungsexperimente werden üblicherweise benutzt, um die Sequenzkomplementarität und damit die Identität zwischen zwei verschiedenen Nukleinsäuremolekülen nachzuweisen.

15 Dabei bedeutet "spezifische Hybridisierung" das unter den hier beschriebenen oder dem Durchschnittsfachmann im Zusammenhang mit *in situ*- und *in-vitro*- Hybridisierungstechniken bekannten stringenten Hybridisierungsbedingungen die Target-Nukleinsäuren stärker an die Sonde binden als die Nicht-Target-

20 Nukleinsäuren und vorzugsweise im wesentlichen nur die Target-Nukleinsäuren, nicht aber Nicht-Target-Nukleinsäuren an die Sonde binden.

Bei einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird somit eine Microarray-Vorrichtung, umfassend ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen

25 immobilisierten Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, bereitgestellt. Die Gesamtheit aus in vorbestimmten Bereichen bzw. in Array-Anordnung auf der Detektionsfläche abgelegten Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der

Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und dem Träger wird im folgenden auch als "Nukleinsäure-Chip", "Chip", "Biochip", "Microarray", "Sondenarray" etc. bezeichnet.

- 5    Als Nukleinsäure-Chips können im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere Chips eingesetzt werden, wie sie von den Firmen Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA) und Clondiag (Jena, Deutschland) vertrieben werden. Beispielsweise werden erfindungsgemäß Nukleinsäurechips eingesetzt, die in Microarray-Vorrichtungen implementiert sind, wie sie in den internationalen
- 10    Patentanmeldungen WO 01/02094 und WO 03/031063 beschrieben sind. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung bezüglich der Anordnung des Chips in einer Vorrichtung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Besonders bevorzugt werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Vorrichtungen mit Nukleinsäure-Chips eingesetzt, wie sie in der internationalen Patentanmeldung WO 03/059516 beschrieben sind. Auf die in diesem Dokument enthaltene Offenbarung bezüglich einer Vorrichtung zur Durchführung von Array-Verfahren wird hiermit ebenfalls ausdrücklich Bezug genommen.

- 20    Insbesondere wird somit als Vorrichtung zum Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ein, z.B. in WO 03/059516 beschriebenes, Reaktionsgefäß eingesetzt, welches eine für ein Laborreaktionsgefäß typische Form und/oder typische Größe aufweist, und bei dem auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten
- 25    Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* angeordnet ist.

Unter Laborreaktionsgefäß mit einer typischen Form und Größe werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Reaktionsgefäß verstanden, die als Einweg-Reaktionsgefäß, in der Standardausführung 1,5 ml fassend, in, insbesondere biologischen bzw. molekularbiologischen, Laboratorien üblicherweise verwendet werden. Derartige Laborreaktionsgefäß werden auch als Tubes und, nach dem bedeutendsten Hersteller, insbesondere als Eppendorf-Tubes oder "Eppis" (Hamburg, Deutschland) bezeichnet. So werden Laborreaktionsgefäß mit einer typischen Form und Größe von Eppendorf als Standard-Reaktionsgefäß oder Safe-Lock-Reaktionsgefäß angeboten. Selbstverständlich können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Reaktionsgefäß von Herstellern wie Greiner (Frickenhausen, Deutschland), Millipore (Eschborn, Deutschland), Heraeus (Hanau, Deutschland) und BIOplastics (Landgraaf, Niederlande) sowie anderen Herstellern eingesetzt werden, die eine Form und Größe aufweisen, wie sie für Laborreaktionsgefäß insbesondere von Eppendorf typisch ist. Beispiele für Laborreaktionsgefäß mit einer typischen Form und Größe sind in Abbildung 16 gezeigt.

Unter Laborreaktionsgefäß typischer Form und Größe werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere nicht Rundkolben oder andere Kolben wie Erlenmeyerkolben, Bechergläser oder Messzylinder verstanden.

20

Ein Reaktionsgefäß im Rahmen der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich von den vorstehenden genannten Reaktionsgefäß dadurch, dass auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Sondenmolekülen angeordnet ist. Trotz der Modifizierung eines herkömmlichen Laborreaktionsgefäßes durch Einbau eines derartigen Chips weist das Reaktionsgefäß eine für ein Laborreaktionsgefäß typische Form und/oder Größe auf. Das Reaktionsgefäß weist somit eine rotationssymmetrische Form, insbesondere eine zylindrische bzw. im Wesentlichen zylindrische Form auf. Von den für

herkömmliche Laborreaktionsgefäße typischen Formen und damit für das erfindungsgemäße Reaktionsgefäß denkbaren Formen ist ferner eine von der zylindrischen Grundform abweichende konische Form umfasst, wobei die Verjüngung vorzugsweise in Richtung der Affinitätsmatrix auftritt. Typische Formen

5 sind ferner Kombinationen von zylindrischen bzw. im Wesentlichen zylindrischen Bereichen und konischen Bereichen (siehe u.a. Abbildungen 1-4 und 21 in WO 03/059516). Aufgrund der für Laborreaktionsgefäße typischen Form und Größe ist das Reaktionsgefäß mit dem darin eingebrachten Chip insbesondere mit üblichen Tischzentrifugen wie beispielsweise von Herstellern wie Eppendorf oder Heraeus

10 kompatibel, d.h. das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip ist zur Zentrifugation in üblichen Tischzentrifugen geeignet. Übliche maximale Außendurchmesser für Standard-Laborreaktionsgefäße und damit auch für das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip liegen im Bereich von 0,8 cm bis 2 cm, vorzugsweise 1,0 cm bis 1,5 cm und besonders bevorzugt 1,1 cm bis 1,3 cm. Weitere bevorzugte

15 Außendurchmesser sind bis 0,9 cm, bis 1,2 cm, bis 1,4 cm, bis 1,6 cm und bis 1,7 cm. Die Höhe des erfindungsgemäßen Reaktionsgefäßes beträgt üblicherweise 1,5 cm bis 5,0 cm, vorzugsweise 2,0 cm bis 4,0 cm, besonders bevorzugt 2,5 cm bis 3,5 cm, und am meisten bevorzugt 2,8 cm bis 3,2 cm. Weitere bevorzugte Höhen sind bis 2,6 cm, bis 2,7 cm, bis 2,9 cm, bis 3,0 cm, bis 3,1 cm, bis 3,3 cm und bis 3,4 cm.

20 In speziellen Ausgestaltungen kann die Höhe auch 1,0 cm oder mehr betragen.

Das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip ist in üblichen Tischzentrifugen zentrifugierbar und kann somit beispielsweise in herkömmlichen Tischzentrifugen wie einer Standard-Tischzentrifuge mit Standard-Rotor von Eppendorf sowie auch in

25 üblichen Racks und Haltern für Reaktionsgefäße wie beispielsweise einem Tube-Rack von Eppendorf eingesetzt werden. Zum Einbringen der zu untersuchenden Probe sowie anderer zur Durchführung der Nachweisreaktion erforderlicher Reagenzien in das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip können übliche Pipetten

oder Spritzen wie beispielsweise variable und Fixvolumen-Pipetten von Eppendorf verwendet werden.

Das Reaktionsgefäß mit Nukleinsäure-Chip weist eine für ein Laborreaktionsgefäß 5 typische Größe auf. Typische Füllvolumina liegen im Bereich von 100 µl bis 2,5 ml, können aber bei speziellen Ausgestaltungen auch höher oder niedriger sein. Besonders bevorzugt hat das Reaktionsgefäß ein für ein Standard-Eppendorf-Tube übliches Füllvolumen von bis zu 1,5 ml. Weitere bevorzugte Füllvolumina sind bis 0,25 ml, bis 0,4 ml, bis 0,5 ml, bis 0,7 ml, bis 1,0 ml oder bis 2,0 ml.

10

Bei einer speziellen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird ein Nukleinsäure-Chip eingesetzt, bei dem ein Glas-Träger mit den darauf immobilisierten Oligonukleotiden direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, wie es in der internationalen Patentanmeldung WO 03/059516 beschrieben ist, eingebunden ist.

15

Derartige Reaktionsgefäße mit Nukleinsäure-Chips werden von der Firma Clondiag beispielsweise als ArrayTube® vertrieben.

Wie bereits vorstehend erwähnt, kann es sich bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der vorliegenden Erfindung um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der 20 Regel zwischen 12 und 100 Nukleotide umfassen wird, bevorzugt zwischen 15 und 50 und besonders bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide. Komplementarität sollte vorzugsweise bei einer Sonde von 15 bis 25 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein.

25

Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht insbesondere unter dem Gesichtspunkt, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegt.

Durch eine wie z.B. im Folgenden beschrieben ausgewählte, definierte Sequenz werden vorzugsweise mindestens 20% oder mindestens 25% und besonders bevorzugt mindestens 30% oder mindestens 35% und am meisten bevorzugt mindestens 45% oder mindestens 50% der Population von Stämmen von

5 *Pseudomonas aeruginosa* erfasst. Derartige ausgewählte bzw. definierte Sondensequenzen liefern zwar nicht ein für einen einzigen Stamm charakteristisches Signal. Durch eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies von derartig definierten Sonden auf der Chip-Oberfläche wird jedoch ein Signalmuster bereitgestellt, das bei geeigneter Anzahl, z.B. etwa 50 oder etwa 70, verschiedener Sondensequenzen für  
10 jeden Stamm charakteristisch ist.

Sonden, die eine Auswahl von mehr als 70% der Population von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* erfassen, sind allerdings weniger bevorzugt, da die Diskriminierung einzelner Stämme durch diese Sonden zu gering sein könnte.

15 Sonden, die eine Auswahl von weniger als 20% der Population von *Pseudomonas aeruginosa* erfassen, sind ebenfalls weniger bevorzugt, da diese zwar eine hohe Selektivität aufweisen, aber nur für wenige Stämme ein Signal liefern und somit für den überwiegenden Teil von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen nicht zur  
20 Information beitragen.

Insbesondere sind die Oligonukleotid-Sonden des erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Chips spezifisch für Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz des Referenzstamms von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen. Als

25 Referenzstamm wird die Sequenz des Genoms des Stamms PAO1 herangezogen, die unter <http://www.pseudomonas.com> zugänglich ist. Vorzugsweise sind die Oligonukleotid-Sonden spezifisch für Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz von konservierten Genen des Referenzstamms PAO1

von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen. Ferner ist es bevorzugt, dass die Basen-  
substitution in mindestens 20%, mindestens 25%, mindestens 30%, mindestens 35%,  
mindestens 40% und besonders bevorzugt mindestens 50% einer Population von  
*Pseudomonas aeruginosa* auftritt. Das heißt, zur Typisierung werden

5 erfindungsgemäß insbesondere Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) aus  
konservierten *Pseudomonas aeruginosa*-Genen ausgewählt, die z.B. in mindestens  
30% und besonders bevorzugt mindestens 50% der Population eine  
Basensubstitution aufweisen. Auf diese Weise können Stämme von *Pseudomonas*  
*aeruginosa* mit einer Nachweisgenauigkeit von mehr als 99,7% bestimmt bzw.  
10 identifiziert werden.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nukleinsäure-  
Chip, insbesondere zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen Sonden,  
Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, nicht in allen

15 Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und vorzugsweise in mindestens  
30% oder mindestens 50% der Population vorkommen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße  
Nukleinsäure-Chip Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch für Nukleinsäuren sind,

20 die in Pathogenitätsinseln im Genom von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen.  
Pathogenitätsinseln stellen distinkte DNA-Bereiche im Genom pathogener Bakterien  
dar, die sich vom restlichen Genom durch die Präsenz mehrerer Pathogenitäts-  
assozierter Gene und durch eine Reihe weiterer struktureller Besonderheiten  
unterscheiden. Insbesondere weisen verschiedene *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme  
25 eine bemerkenswerte genomische Diversität auf, die im Wesentlichen durch die  
Insertion oder Deletion von mobilen DNA-Einheiten wie (Pro)phagen, Plasmiden  
oder anderen Elementen verursacht wird. Derartige Pathogenitätsinseln liefern somit

ebenfalls wertvolle Informationen für die Diskriminierung von unterschiedlichen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfassen der erfindungsgemäße Nukleinsäure-5 Chip, insbesondere zusätzlich zu den für die Diskriminierung unterschiedlicher *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme geeigneten Sonden, Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die in krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen. Das Wissen über das Vorliegen bestimmter krankheitsassozierter Gene lässt Aussagen über die Prognose des erkrankten Patienten zu und erleichtert 10 somit die weitere Behandlung.

Bei einer weiteren Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Nukleinsäure-Chip Oligonukleotid-Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die in für Flagellen von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden Genen enthalten sind. Für 15 *Pseudomonas aeruginosa* liegen zwei verschiedene Typen von Flagellen vor. Die Information über den Flagellentyp des detektierten *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm kann dem Arzt einen Hinweis für entsprechend einzusetzende Impfstoffe geben.

Bei Verwendung eines Nukleinsäure-Chips, der sämtliche Kategorien der vorstehend 20 beschriebenen Oligonukleotid-Sonden umfasst, d.h. Sonden, die für SNP's spezifisch sind; Sonden, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, die nicht in allen Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* vorliegen; Sonden, die für Nukleinsäuren in Pathogenitätsinseln spezifisch sind; Sonden, die für krankheitsassoziierte Gene spezifisch sind; und Sonden, die für Flagellen-kodierende Gene spezifisch sind, 25 erhöhen die Genauigkeit bei der Bestimmung von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme auf mehr als 99,9%.

Insbesondere haben die Oligonukleotid-Sondenmoleküle die nachstehend angegebenen Längen von Sequenzen (alle Nukleinsäuremoleküle sind in 5'-3'-Richtung notiert). Die erfindungsgemäßen Oligonukleotid-Sondenmoleküle sind zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* 5 und insbesondere zur Geno- und Pathotypisierung der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* geeignet und werden dementsprechend insbesondere in dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren eingesetzt. Des Weiteren sind die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotid-Sonden aber auch für den Einsatz in beliebigen anderen dem Fachmann bekannten Verfahren zum Nachweis bzw. der 10 Markierung von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* geeignet.

Im Folgenden werden die Oligonukleotide bzw. Nukleinsäure-Sondenmoleküle aufgeführt, die bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen für die Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* geeignet sind:

15            GCGGAAAACCTCCTGCACATGATGTT  
              GCGGAAAACCTCCTCCACATGATGTT  
              AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG  
              AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG  
20            AAGAGGACGGCCGCCGGGTGACGCC  
              AAGAGGACGGCCGCCAGGTGACGCCG  
              GACAAGATGCGCCTCGACGACC  
              GACAAGATGCGTCTCGACGACCG  
              AGCCGACCTACGCGCCGGGCAG  
25            CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG  
              CCGTCGAACGGCTCATGGAGCA  
              GCCGTTCGAACGACTCATGGAGCA  
              TGGAGCAGCAAGTGTCCCCGGC

TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC  
GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG  
AACAAAGACCGGCTCCACCAACGG  
GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT  
5 GCGACCTGGGACTGGTGATCCT  
GCCGACCAACTGAACCTCCAACTCG  
GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA  
CAGCCTGCGGTATGTCCTCGG  
CGCCAGTTGAGAACGGAGTCACC  
10 GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG  
GCCTCCCGATTGAACATCGTGAT  
GTAGCCGGAGTCGAGCGGAATCAT  
GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT  
CGAGGAGTTCGGACCCGCTTGA  
15 AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT  
GCGCCTTCTCCTCTTGCAGATGT  
CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC  
GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT  
TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA  
20 AATTGATGGCTTCTCAGGCGCAGG  
AGTCATGGGACTGAATAACGGCGACT  
TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG  
TGGTAGCTCTGACGTACTGGCTG  
CCCGTTGCTCATAACCCGTTCTG  
25 AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG  
ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT  
AGCGTCCCTGACCAACCTCATCAG  
GCCAACAAATTGCCATTACAGCG

TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG  
CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC  
AGCCCAGCAATTGCGTGTTCCTCCG  
AGCCCAGCAACTGCGTGTTCCTCC  
5 GCTGCTGGCGGCCGGTGTGC  
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT  
CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG  
GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG  
ACGGCCGCCGGGTGACGCC  
10 ACGGCCGCCAGGTGACGCCG  
GCCGACCTACGCGCCGGGC  
AGCCGACCTATGCGCCGGGCA  
GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA  
GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG  
15 CAGCCCAGTCAGGACGCGCA  
AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC  
GTGTCACGGCCCATGTCTAGCAGC  
CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC  
CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG  
20 CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG  
CCTGGACCTCTCCAAGGTTCGCCT  
GCCATTCCGACGACCAAACAAGGC

Daneben ist auch der Einsatz von Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend  
25 beschriebenen Abwandlungen im Rahmen der vorliegenden Erfindung denkbar, die  
für die folgenden Nukleinsäuren spezifisch sind:

GTCTCCCTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTCGGTTGCGTAGCCGAC

- 21 -

ATGTTGTATTTCTTGCAGGTATGAAGATGGGTGGTGGGTCGGATATAG  
GTACTTCTCTATTCTTAATTGCTCTTATCTATGG

5 GACCTCGACCCCCGAGGGCTTCATGGCGTGTGCGAACATCGCATGGCAAC  
AGGC

TGGTCAGCCGAGTAACCGGCAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAATCCCGCC  
ATTAGCTTGATTGACGGAACTATAGCGACTTGGTCCAACCTGGCCCA

10 G

ATGGGCAAGAGAGTGGTTGTATTGCTATGGCTGCTATTCACATCAATGTC  
AGCCCACGCCATCGATAAAAAAGTCAA

15 CGGCTCGGACATGGCCAATTGGGTCAAGCAAGCAACGCGCCGGAGGCATG  
CCTGGGTTGCCAGGGCGGTGCC

GTTCCCTGGAACGAGGGTGATGGCTGGGAATACGTGGAGGCGCCACAGCC  
G

20

ATGTTCGTACATGACAAGCGACTGCAGTACACCGTCAGGGTCGC

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene  
Abwandlungen sind vor allem zum spezifischen Nachweis von SNPs in  
25 konservierten Genen von *Pseudomonas aeruginosa* geeignet:

oriC T-C_wt	GAAGCCCAGCAATTGCGTGTTC
oriC T-C_mut_1	GAAGCCCAGCAACTGCGTGTTC

	oriC T-C_wt_1	AGCCCAGCAATTGCGTGTTCCTCCG
	oriC T-C_mut_2	AGCCCAGCAACTGCGTGTTCCTCC
	oprL T-C_wt_1	GGTGCTGCAGGGTGTTCGCCGG
	oprL T-C_mut_1	GGTGCTGCAGGGCGTTGCCGG
5	fliC a A-T_wt_1	CAAGATCGCCGCAGCGGTCAAC
	fliC a A-T_mut_1	CAAGATCGCCGCTGCGGTCAAC
	alkB2 G-A_wt_2	GCTGCTGGCGGCGGTGTGC
	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT
	alkB2 A-G_wt_1	CCTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG
10	alkB2 A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCCGCCGCTCTGG
	citS A-G_wt_1	TCGAGCAACTGGCAGAGAAAATCCG
	citS A-G_mut_1	CGAGCAACTGGCGGAGAAAATCCG
	citS G-C_wt_1	GCGGAAAAACTTCCTGCACATGATGTT
	citS G-C_mut_1	GCGGAAAAACTTCCTCCACATGATGTT
15	oprI T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG
	oprI T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
	oprI T-C_wt_2	CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG
	oprI T-C_mut_2	GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG
	ampC_1 G-A_wt_2	ACGGCCGCCGGGTGACGCC
20	ampC_1 G-A_mut_2	ACGGCCGCCAGGTGACGCCG
	ampC_2 C-T_wt	GACAAGATGCGCCTCGACGACC
	ampC_2 C-T_mut_1	GACAAGATGCGTCTCGACGACCG
	ampC_3 C-T_wt	AGCCGACCTACGCGCCGGGCAG
	ampC_3 C-T_mut_1	CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG
25	ampC_3 C-T_wt_1	GCCGACCTACGCGCCGGGC
	ampC_3 C-T_mut_2	AGCCGACCTATGCGCCGGGCA
	ampC_4 G-A_wt_2	GTTCGAACGGCTCATGGAGCAAGCA
	ampC_4 G-A_mut_2	GTTCGAACGACTCATGGAGCAAGCAAG

- 23 -

	ampC_5 G-C_wt_1	TGGAGCAGCAAGTGTCCCCGGC
	ampC_5 G-C_mut_1	TGGAGCAGCAACTGTTCCCCGGC
	ampC_6 T-C_wt	GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG
	ampC_6 T-C_mut_1	AACAAGACCGGCTCCACCAACGG
5	ampC_7 C-A_wt	GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT
	ampC_7 C-A_mut_1	GCGACCTGGGACTGGTGATCCT
	oprL T-C_wt_2	GTGCTGCAGGGTGTTCGCCG
	oprL T-C_mut_2	GCTGCAGGGCGTTGCCG
	oprI T-C_wt_3	GCTCAGCAGACTGCTGACGAGGCTAACG
10	oprI T-C_mut_3	GCTCAGCAGACCGCTGACGAGGCTAAC
	ampC_3 C-T_wt_2	CGACCTACGCGCCGGGCAG
	ampC_3 C-T_mut_3	CGACCTATGCGCCGGGCAGC
	ampC_4 G-A_wt_3	CGTTCGAACGGCTCATGGAGCAG
	ampC_4 G-A_mut_3	CGTTCGAACGACTCATGGAGCAGC
15	ampC_7 C-A_wt_1	CGACCTGGGCCTGGTGATCCT
	ampC_7 C-A_mut_2	GCGACCTGGGACTGGTGATCCTGG

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene  
Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von DNA-Sequenzen geeignet, die  
20 nicht in allen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen vorkommen.

	C-47-1	GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG
	C-45	CGAGGAGTTCTGGACCCGCTTG
	C-46	AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT
25	C-46_1	CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC
	C-spezifisch-1	GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT
	pKL-3	TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA
	pKL-11	AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT

	PAGI-1-1	TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG
	PAGI-1-8	TGGTAGCTCTCGACGTACTGGCTG
	SG17M-1	CCCGTTGCTCATAACCCGTTCTG
	SG17M-4	AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG
5	C-Inselspez.-4	GCGCCTTCTCCTCTTGAGATGT
	C-Inselspez.-5	CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC
	TB-C47-3	TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG
	TB-C47-4	CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC
	fliC a A-T_wt_2	CAAGATGCCGCAGCGGTCAACGAC
10	fliC a A-T_mut_2	CAAGATGCCGCAGCGGTCAACGAC
	PA2221	CAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAACATCC
	PA3835	CACATCAATGTCAGCCCCACGCCA
	PA0728	CTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTC
	PA2185	ACGAGGGTGATGGCTGGGAATACG
15	PA0636	GCCAATTGGGTCAAGCAAGAACG
	PA0722	CGTGTGCGAACACTCGCATGGC
	Pyov-Rez-Type_I	CCTGAATCCGACCATTGCGAGTC
	Pyov-Rez-Type_IIa	TCGGACTGTACTCCTACGAAGCAGC
	Pyov-Rez-Type_IIb	CCAATCCCTATCGCTGGAACCGTACC
20	Pyov-Rez-Type_III	GCTCGGGACTCGCATTGTC
	Pyov-Rez-Fpv_B	GCGTTATTGCTCGGTCTCTCCTCG
	C-Inselspez.-1	GACCGCAAGCAGAAACGGCATGC
	C-Inselspez.-6	CCATGGTCGGAACAGGCACGATATGC
	C-47-1_2	CCACTCGATCATGTTGAGCATGGCTCC
25	SG17M-8	GGTTAGTCCCTCTGCCCGCATCG

Die folgenden Oligonukleotid-Sonden bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von Pathogenitätsinseln geeignet:

- 25 -

	47D7-1_1	GTGTCACGGCCCATGTCTAGCAGC
	47D7-2	GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT
	fla-insel-1	ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT
5	Fla-Insel-2_orfA	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG
	Fla-Insel-2_orfC	CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG
	Fla-Insel-2_orfI	CCTGGACCTCTCCAAGGTTCGCCT
	Fla-Insel-2_orfJ	GCCATTCCGACGACCAAACAAGGC
	47D7-2_2	AGGCCATGGGCTAGCCGGATGC
10	PAPI-2-XF1753	CGAAGCGTAGGGTCTCGTAGCC
	PAPI-2-acetyltrans	TGCGAGGACCAGAAACCTTGATGG
	PA0980	CGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTCG
	LES	TGCATAGGAGTCATGCCGACAGCA
	PKLC102-unbekannt	GCCTGCCTACTTGTTCACCGC
15	PKLC102-adhesin	GGCTGTATTGCCCGCCATTCTCC
	PKLC102-stoffw	CGACAGACAGAAAGGGTTCTGCGC
	pKL-1	CACCATGCAAATGCTCGATGGACTGC
	TB-C47-3_2	GCAGGCGTCCAAGTTGGAGCTCTCC
	PAPI-1_pili-chap	GGAACACAAACGTGGGGCGTGAC
20	PAPI-1_lum_bin_pro	CCAGTTGGCACCCATGCTTGC

Die folgenden Nukleinsäure-Sondenmoleküle bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zum Nachweis von krankheitsassoziierten Genen wie exoS und exoU geeignet:

25

	exoS-1_1	CAGCCCAGTCAGGACGCGCA
	exoU	CGCCAGTTGAGAACGGAGTCACC
	exoU_1	AGTGACGTGCGTTCAGCAGTCCC

Die folgenden Nukleinsäure-Sondenmoleküle bzw. deren nachstehend beschriebene Abwandlungen sind insbesondere zur Identifizierung des Flagellentyps geeignet:

5    fliC b                    GCCGACCAACTGAACCTCCAACTCG  
                                  fliC a                    GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA

Gegenstand der Erfindung sind neben den Oligonukleotid-Sonden mit den vorstehend aufgeführten Sequenzen auch Abwandlungen der vorstehend genannten  
10    Oligonukleotide, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit Ziel-Nukleinsäuren bzw. Target-Nukleinsäuren zeigen und dadurch einen spezifischen Nachweis von Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* und insbesondere die Geno- und Pathotypisierung *Pseudomonas aeruginosa* gewährleisten.

15

Unter diese Abwandlungen fallen insbesondere

- a)    Nukleinsäuremoleküle, die (i) mit einer der obigen Oligonukleotid-Sequenzen in mindestens 80%, bevorzugt in mindestens 90% und besonders bevorzugt in  
20    mindestens 92%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen, oder die (ii) sich von obigen Oligonukleotid-Sequenzen durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Target-Nukleinsäuren von Stämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ermöglichen.
  
- 25    b)    Nukleinsäuremoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einem der unter a) genannten Nukleinsäuremoleküle komplementär ist, unter stringenten Bedingungen (siehe unten) hybridisieren.

c) Nukleinsäuremoleküle, die eine Oligonukleotid-Sequenz nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen und eine spezifische Hybridisierung mit Target-Nukleinsäuren ermöglichen.

5

Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäure-Sondenmoleküls mit den oben explizit genannten Oligonukleotid-Sondenmolekülen kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hierzu beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf dieser

10 Seite z.B. der Link "Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]") zugänglich ist.

"Hybridisieren" kann im Rahmen dieser Erfindung gleichbedeutend sein mit "komplementär". Im Rahmen dieser Erfindung sind auch solche Oligonukleotide umfasst, die mit dem (theoretischen) Gegenstrang eines erfindungsgemäßen

15 Oligonukleotids einschließlich der erfindungsgemäßen Abwandlungen hybridisieren.

Der Begriff "stringente Bedingungen" steht allgemein für Bedingungen, unter denen eine Nukleinsäuresequenz präferentiell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder gar nicht an andere Sequenzen.

20 Stringente Bedingungen sind z.T. sequenzabhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5°C unter dem thermischen Schmelzpunkt (Tm) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem

25 definierten pH liegt. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtzustand hybridisieren.

Es versteht sich, dass der Fachmann die Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffers derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Unter Einsatz der stringenten Bedingungen

5 kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül einen spezifischen Nachweis von Target-Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen

10 Microarray-Vorrichtung sind auf mindestens einem Array-Element sog. Kontrollsonden angeordnet. Derartige Kontrollsonden dienen z.B. zur Kontrolle der erfolgten Target-Markierung, der Amplifikationsreaktion, der Hybridisierungsreaktionen sowie – insbesondere bei Nachweisverfahren durch Präzipitation – der Färbung des Niederschlags.

15 Derartige Kontrollsonden weisen z.B. eine spezifische Komplementärität entweder zu einem extern zugegebenen Target oder zu einem in allen mit dem Array zu untersuchenden Samples in ausreichender Konzentration vorhandenen Target auf. Unter ausreichender Konzentration wird in diesem Zusammenhang eine

20 Konzentration an Targetmolekülen verstanden, die zu einem signifikanten, d.h. deutlich detektierbaren Signal nach der Wechselwirkung mit den Sonden führt. Vorzugsweise sind die Array-Elemente, auf denen derartige Kontrollsonden angeordnet sind, über die gesamte Fläche des Arrays verteilt, besonders bevorzugt sind sie gleichmäßig verteilt. Eine Verteilung über die gesamte Fläche des Arrays

25 bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass sich ausgehend von dem Mittelpunkt der Array-Oberfläche in verschiedenen Abständen und verschiedenen Richtungen Array-Elemente mit derartigen Kontrollsonden befinden. Eine gleichmäßige Verteilung bedeutet vorzugsweise eine Anordnung der Array-Elemente

mit derartigen Kontrollsonden als einheitliches Raster, beispielsweise als 10x10-Raster, bei dem jedes zehnte Array-Element ein derartiges Array-Element mit Kontrollsonden ist. Diese Ausführungsform ermöglicht z.B. die Normalisierung von experimentellen Schwankungen, die nach der Herstellung des Arrays u.a. in

5 Abhängigkeit von dem Ort des Array-Elements auf der Array-Oberfläche auftreten können.

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*

10 in einer Probe bereitgestellt wird, welches die folgenden Schritte umfasst:

- a) In Kontakt bringen der Probe mit einem wie vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Chip mit Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*; und
- 15 b) Detektion der Wechselwirkung zwischen den Oligonukleotid-Sonden und in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren.

Die zu untersuchenden Target-Nukleinsäuren bzw. die nachzuweisenden und zu

20 typisierenden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme können in jeder Art von Probe, vorzugsweise in einer biologischen Probe vorliegen. Insbesondere wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Untersuchung medizinischer Proben, z.B. von Stuhlproben, Blutkulturen, Sputum, Gewebeproben (auch Schnitten), Wundmaterial, Urin, Proben aus dem Respirationstrakt, Implantaten und Kathetheroberflächen

25 eingesetzt werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens werden die in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren vor der

Detektion amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt üblicherweise durch herkömmliche im Stand der Technik bekannte PCR-Methoden. Vorzugsweise wird die Amplifikation als Multiplex-PCR ausgeführt (siehe auch WO 97/45559). Bei einer Multiplex-PCR wird mehr als ein Primer pro Template-DNA in der Polymerase-5 Kettenreaktion verwendet. Das Ziel einer Multiplex-PCR ist die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Bereiche der Target-DNA, um auf diese Weise Zeit zu sparen und Kosten zu minimieren.

Vorzugsweise werden bei der Amplifikation durch Multiplex-PCR Primer eingesetzt, 10 die in etwa dieselbe Schmelztemperatur und in etwa dieselben Bindungskinetiken aufweisen. Auf diese Weise wird eine gleichmäßige Amplifikation sämtlicher Target-Nukleinsäuren gewährleistet und so ein exakter Nachweis auch in unterschiedlicher Ausgangskonzentration vorliegender Target-Nukleinsäuren sichergestellt. Unter einer in etwa gleichen Schmelztemperatur bzw. einem ähnlichen 15 Schmelzpunkt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Schmelztemperatur bzw. ein Schmelzpunkt verstanden, die bzw. der vorzugsweise höchstens 5°C und besonders bevorzugt höchstens 3°C von dem Vergleichsschmelzpunkt abweicht.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Amplifikation linear, 20 d.h. nur auf einem DNA-Strang der Target- bzw. Template-Nukleinsäure durchgeführt. Dadurch wird vermieden, dass auch nur geringe Unterschiede bei den Schmelzpunkten und Bindungskinetiken der Primer wie bei der exponentiellen Amplifikation mittels herkömmlicher PCR zu großen Unterschieden in den nach Abschluss der Amplifikation vorliegenden Konzentrationsverhältnissen der Target- 25 Nukleinsäuren führen, was einen Nachweis von nur geringer Ausgangskonzentration vorliegenden Target-Nukleinsäuren neben in hohen Ausgangskonzentrationen vorliegenden Target-Nukleinsäuren verhindern würde.

Insbesondere haben die im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Primer die nachstehend angegebenen Mengen und Sequenzen (alle Primer sind in 5'-3'-Richtung notiert). Die im Folgenden aufgeführten Primer sind jedoch auch für beliebige andere dem Fachmann bekannte Verfahren zur Amplifikation von  
5 Nukleinsäuren geeignet.

47-1/23

ACGCGGATGTCCTGGATTGG

10 47-1/39

CTGAAGAAGGGCGCTACGCG

47-2/22

GCGTACCGGGCAAGGTGATAG

15

47-2/52

CTCGGTGAAACATCGGGAGGG

C45/18

20 TCATCCAGCAAGCCATTGCGC

C45/60a

GGAGTCGCTTCGCCATCG

25 C45/60b

TGGAGTCGCTTCGCCATCG

- 32 -

C46/15

AAGGGCGTTCACGCTGACGC

5 C46/22

ATCCGGAAGGGCGTTCACG

C46/88

TCCACACCTCAGACTTCGGCG

10

C47-1/43

TATTGACGACCTACCGCGCGC

C47-2/56a

15 GCAACTGATGTTCGCCCAGC

C47-2/56b

CGCAACTGATGTTCGCCCAGC

20 C47-2/59

ACACGCAACTGATGTTCGCCC

CIS-4/36

TGTCCCGGCTCAGTTCAACG

25

CIS-4/50

AACACCTTGGCGTTGTCCC

- 33 -

CIS-4/51

GCAACACCTTGGCGTTGTCC

5 CIS-5/4

TCAAGCTCGTTGTGGACCGC

CIS-5/48

GTTACGACGGCGTGCTGTCGG

10

CSP-1/39a

ACGCAACGTATTGGCGACCC

CSP-1/39b

15 CGCAACGTATTGGCGACCC

fliAT/28

AGCTGATGGTATGCCGTCGC

20 fliAT/72

CTAGTGATCGCACCGGAGCC

oriC/20

AGCCTCGACACCGGTTCTCG

25

oriC/54

TCGTTCATCCCCAGGCTTCG

- 34 -

oriC/59

ACCATCTCGTTCATCCCCAGG

5 oprL/53

TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG

oprL/65

TCGACGCGACGGTTCTGAGCC

10

fliCb/36

TGACGTTCTCGCCGGTAGCG

fliCb/65

15 CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG

fliCb/66

CAGTAGCGGTACCGGTCTGC

20 alkAG/27

TTCCTCGCCGGCATAGTAGGC

alkGA/32

GGGGTCGAGACGTGTACATGG

25

alkGA/51

CGAGGACGAGGCATCTTCCGG

- 35 -

citAG/4

GCAGGTAGCAGGTTCCAGG

5 citAG/46

AACTGTTCCCTCTGCGCGGCG

citGC/8

TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG

10

citGC/11

GCTGATCGGCTTGGTCTCGC

citGC/75

15 GAGGCGTTCTGCTCGTGGTCG

oprI/12

TTTTTCCAGCATGCGCAGGG

20 oprI/17

GCTGGCTTTTCCAGCATGCG

oprI/22

TTGCGGCTGGCTTTTCCAGC

25

am7CA/1

TTGGGATAGTTGCGGTTGGC

- 36 -

am7CA/27

CGTAGGCGATCTTCACCCGC

5 am7CA/29

TGGCGTAGGCGATCTTCACCC

am3CT/21

GGCGAGATAGCCGAACAGGC

10

am3CT/22

GC GGCGAGATAGCCGAACAGGG

am3CT/69

15 CACTGCTGCTCCATGAGCC

am2CT/35

GAGGTCGAGCAGGCTGATGC

20 am2CT/42

TAGGTCGCGAGGTCGAGCAGG

am2CT/92

GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

25

am1GA/49

CGCATCTTGTCTGGGTCAAGG

- 37 -

am1GA/58

TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC

5 am45/1

ACGTCGAGGTGGGTCTGTCG

am45/96

GTAGCCTTCGGCATCCAGCG

10

am6TC/60

TCGGCATTGGGATAGTTGCGG

GI11/15

15 CCTCCTGTCTCATGCCGATGC

GI11/59

GCATTCGCCACGGAAGGAAGG

20 GI11/71

GAAGGCATCATGGCATTGCC

GI18/62

GTCATGGGTTCCCAGAGACC

25

fliCa/41

GATCGCGATGTCGACGGTGCC

- 38 -

fliCa/42

CGATCGCGATGTCGACGGTGC

5 fliCa/46

TGCCGATCGCGATGTCGACG

SG-1/40

GACGAATAACCCAGCTGCGTGG

10

SG-1/43

GCAGACGAATAACCCAGCTGCG

SG-4/1

15 CGCGACGTCGTGACGTCAGC

SG-4/67

ACTTCGGCTCTCGGGCTGG

20 TB46/21

AGGTAGAGACTCGGGGGAAACC

TB46/45

TCGTTTCGGTCATGGCCAGG

25

TB471/22

TTCCCGCGACGAACATCCGTGG

TB471/25

CGCTTCCGCGACGAACATCCG

5 TB472/36

GGATCGCTCCGATAGGGCAGC

TB472/84

AGAGGCATGGGTCTGTACCG

10

TB473/34

TCTGTCAATCCCCTTGGGG

TB473/41

15 AGCCCCTTCTGTCAATCCCC

TB474/36

GGCTTCCTACCGAAGGTCAGG

20 TB474/41

TGAGGGCTTCCTACCGAAGG

exoS/31

TTCAAGGTCATGGGCAATGCC

25

exoS/37

AGTCCCTTCAAGGTCATGGGC

- 40 -

exoU/22

GCCGACTGAGCTGTAGCTCG

5 exoU/23

GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG

exoU/42

ACCAGACTGGTCAATGGTGG

10

flins/2

CCCGTGTTCCTCGTAGACCTTGC

pKL11/49a

15 AGCAGTTACCCACAGCATGG

pKL11/49b

CAGCAGTTACCCACAGCATGG

20 pKL3/47

CTACACTCCAACCGCTGGTCC

pKL3/50

GACCTACACTCCAACCGCTGG

25

pKL3/80

TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC

- 41 -

pKL7/14

TAATA~~GGCGAGCCTGCCGTCC~~

5 47D7nw1a

TCCACGCCGAGGGACGTGCC

47D7nw1b

GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC

10

C46-nw1a

CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC

C46-nw1b

15 CCAATGCCAGGGCCAGCGGA

C46-nw1c

CGCTGGCAGTTCCGCTGGCC

20 ExoSnw1a

CAGGGTCGCCAGCTCGCTCGCC

ExoSnw1b

AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC

25

ExoUnw1a

AGTGATCTGCCGCCGCCCTGCC

ExoUnw1b

GTGATCTGCCGCGGCCCTGC

5 OrfA-1

GTTCCACAGGCGCTGCGGCGC

OrfA-2

GTTCCACAGGCGCTGCGGCG

10

OrfA-3

CAAAGCCCCCTGGTCGCGCGG

OrfC-1

15 GCAGCTTTCCACCGCCGGCGG

OrfI-1

AAACTGCCCGCCCCCATCC

20 OrfI-2

GGAAAAACTGCCCGCCCCCCC

OrfJ-1

ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG

25

OrfJ-2

GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC

- 43 -

PA2221/37\_Pa-P\_064

TTCCTGGGCCAGAGTTGGACC

5 PA2221/66\_Pa-P\_065

AGCTTAAGGCCGTGGCACTCG

PA3835/46\_Pa-P\_066

CCGGAGAATT~~CG~~CGTCCACC

10

PA3835/72\_Pa-P\_067

TGCTGACGATGAAGCCCCAGC

47-22/3\_Pa-P\_072

15 AGGAGGCCGAT~~G~~ACAACACCC

47-22/67\_Pa-P\_073

TGCCGATTCCATGCTCACGCC

20 pI2X1753/29\_Pa-P\_074

ACGACGTCACCGTCGAGACCG

pI2X1753/69\_Pa-P\_075

ACCGCCTTCTGGTGAGCTGG

25

PA0728/42\_Pa-P\_076

AGCCAAGACGGTTGTCGCGG

- 44 -

PA0728/88\_Pa-P\_077

TCAATGACGCCGAGTTGGCGC

5 PA2185-1/42\_Pa-P\_078

CTCGGACAGGTTCACGCTGG

PA2185-1/70\_Pa-P\_079

GCCATTGCTGCAACACCTCC

10

pI2actrf/39\_Pa-P\_085

GCGCGCGTTCGAGAACACAGG

pI2actrf/93\_Pa-P\_086

15 CGGAGGTTGAAAAGCTGGCCC

PA0636/29\_Pa-P\_087

ATGCCATCGTTGAAGGCACCGC

20 PA0636/30\_Pa-P\_088

TGCCATCGTTGAAGGCACCG

PA0722/4\_Pa-P\_089

TCTGGCGGAATCAGGTAGGCC

25

PA0722/55\_Pa-P\_090

CTTCCGGGGAGAAACCACCG

- 45 -

PA0980/45\_Pa-P\_093

ACCTCCAGCACCGACACACC

5 PA0980/53\_Pa-P\_094

ATCCGATCCACCTCCAGCACC

Fpval/23\_Pa-P\_095

CGTTCAGGTCTAGACCGCGC

10

Fpval/84\_Pa-P\_096

GCGATACCAACTGTCCTGCGGC

FpvalIa/34\_Pa-P\_097

15 TGCCGAAGGTGAATGGCTTGCC

FpvalIa/65\_Pa-P\_098

CCTGATGGTCCGATCCCAGC

20 FpvalIb/44\_Pa-P\_099

GCCGAGGGTCAAGAACCACTGG

FpvalIb/67\_Pa-P\_100

TCTTGGCCCAGTCATAGCGGC

25

FpvalIII/16\_Pa-P\_101

TAACCCCAAGGCCATTGGAGG

- 46 -

FpvaIII/31\_Pa-P\_102

GCCACCGCCTTCGAATAACCCC

5 FpvB/57\_Pa-P\_103

AATTGCTCGAGGGATGCGGC

FpvB/92\_Pa-P\_104

GGTCGAAACGGATGCGCAGG

10

LES/11\_Pa-P\_105

GCCCCGCGTCATTTCACGTCG

LES/57\_Pa-P\_106

15 AATGCTCTGGGCAACGAGCC

pKLunbek/63\_Pa-P\_107

CTACCCAGCTTGGGCGTAGC

20 pKLunbek/141\_Pa-P\_108

AAGCGATAGCCGTGCTCCTGC

pKLadh/13\_Pa-P\_109

CCGGCTATATCCGCGGCTACC

25

pKLadh/59\_Pa-P\_110

ATTGGCGCTGCTGTTACGCC

pKLStw/30\_Pa-P\_111

GGTGGCGTCGGGTTTTCTGC

5 pKLStw/46\_Pa-P\_112

AGGTCGTAGCGGAAGGTGGTGG

pKL-1/22\_Pa-P\_113

ATCTGAACCGAGGGGATCCGC

10

pKL-1/61\_Pa-P\_114

CCCGGGAGTCATTGGTCTGG

T47-32/19\_Pa-P\_117

15 GCCTGTTGGACCCCTTGACC

T47-32/26\_Pa-P\_118

TACTCCTGCCTGTTGGACCCC

20 pI1pil/15\_Pa-P\_121

CGCTCAAGCGCTATCCCACC

pI1pil/41\_Pa-P\_122

CGCCATCGGCCTGTACAACG

25

pI1lumin/87\_Pa-P\_123

CGGTAGAGAGCTGGGTTGGC

- 48 -

pIllumin/209\_Pa-P\_124

AACCTGGAGCTAGGGCAGAGC

5 C-Ins1/39\_Pa-P\_125

GGTGCTCGACCCAAGCATCG

C-Ins1/57\_Pa-P\_126

TCCTTGAGTTCCCTTGGCGCGG

10

C-Ins6/42\_Pa-P\_131

CAACACGCGACTGGCGATCC

C-Ins6/61\_Pa-P\_132

15 TACATCATCCGCAACGGCGGC

C47-12/2\_Pa-P\_137

TATTGACGACCTACCGCGCGCC

20 C47-12/94\_Pa-P\_138

CACCAAGAACCCGCTGCTCG

SG-8/14\_Pa-P\_141

ATCGTGGCAGGATGTCCACCG

25

SG-8/86\_Pa-P\_142

TAGGCGGGCCTTTGAAGGTGC

Gegenstand der Erfindung sind neben Primern mit den vorstehend aufgeführten Sequenzen auch Abwandlungen der obigen Primer, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit den Template-Nukleinsäuren der jeweiligen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zeigen und sich  
5 dadurch für den Einsatz bei der Amplifikation der Target-Nukleinsäuren eignen.

Hierunter fallen insbesondere

- a) Primer, die (i) mit einer der oben explizit genannten Primersequenzen in  
10 mindestens 80%, bevorzugt in mindestens 90% und besonders bevorzugt in  
mindestens 92%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen, oder die (ii) sich von obigen  
Primersequenzen durch eine oder mehrere Deletionen und/oder Additionen  
unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Template- bzw. Target-  
Nukleinsäuren von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen ermöglichen.
- 15 b) Primermoleküle, die mit einer Sequenz, die zu einer der unter a) genannten  
Primermoleküle komplementär ist, unter stringenten Bedingungen (siehe oben)  
hybridisieren.
- 20 c) Nukleinsäuremoleküle, die die Sequenz eines Primermoleküls nach a) oder b)  
umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen  
nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen und eine spezifische  
Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Target-Organismen ermöglichen.

25 Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden für die Amplifikation pro  
Target-Nukleinsäure zwei geeignete Primer parallel eingesetzt.

Der Nachweis erfolgt bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise dadurch, dass die gebundenen bzw. hybridisierten Target-Nukleinsäuren mit mindestens einer Markierung versehen sind, die in Schritt b) detektiert wird.

- 5 Wie bereits vorstehend erwähnt, ist die Markierung, die an die Targets oder Sonden gekoppelt ist, vorzugsweise eine detektierbare Einheit oder eine über eine Ankergruppe an die Targets oder Sonden gekoppelte detektierbare Einheit. Hinsichtlich der Möglichkeiten der Detektion bzw. der Markierung ist das erfindungsgemäße Verfahren äußerst flexibel. So ist das erfindungsgemäße
- 10 Verfahren mit einer Vielzahl physikalischer, chemischer oder biochemischer Detektionsverfahren kompatibel. Voraussetzung ist lediglich, dass die zu detektierende Einheit bzw. Struktur direkt an eine Sonde oder ein Target, beispielsweise ein Oligonukleotid gekoppelt bzw. über eine mit dem Oligonukleotid koppelbare Ankergruppe verknüpft werden kann.

15

Die Detektion der Markierung kann auf Fluoreszenz, Magnetismus, Ladung, Masse, Affinität, enzymatischer Aktivität, Reaktivität, einer Goldmarkierung und dergleichen beruhen. So kann die Markierung beispielsweise auf der Verwendung von Fluorophor-markierten Strukturen bzw. Bausteinen basieren. In Verbindung mit

- 20 der Fluoreszenz-Detektion kann die Markierung ein beliebiger an Targets oder Sonden während oder nach deren Synthese koppelbarer Farbstoff sein. Beispiele hierfür sind Cy-Farbstoffe (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Alexa-Farbstoffe, Texas-Rot, Fluorescein, Rhodamin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), Lanthanide wie Samarium, Ytterbium und Europium (EG&G, 25 Wallac, Freiburg, Deutschland).

Neben Fluoreszenz-Markern können im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Markierung bzw. als Detektiereinheit, die mit den Targets bzw. Sonden gekoppelt ist,

auch Lumineszenz-Marker, Metall-Marker, Enzym-Marker, radioaktive Marker und/oder polymere Marker eingesetzt werden.

Ebenso kann eine Nukleinsäure als Markierung (Tag) genutzt werden, die durch

5 Hybridisierung mit einem markierten Reporter detektiert werden kann (Sandwich-Hybridisierung). Einsatz zum Nachweis des Tags finden diverse molekularbiologische Nachweisreaktionen wie Primer-Extension, Ligation und RCA.

10 Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die detektierbare Einheit über eine Ankergruppe mit den Targets oder Sonden gekoppelt. Bevorzugt verwendete Ankergruppen sind Biotin, Digoxigenin u.dgl. Die Ankergruppen werden in einer anschließenden Reaktion mit spezifisch bindenden Komponenten, beispielsweise Streptavidin-Konjugaten oder Antikörper-Konjugaten

15 umgesetzt, die selbst detektierbar sind oder eine detektierbare Reaktion auslösen. Bei Einsatz von Ankergruppen kann die Umsetzung der Ankergruppen in detektierbare Einheiten vor, während oder nach Zugabe der Probe umfassend die Targets bzw. ggf. vor, während oder nach der Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sonden erfolgen.

20 Die Markierung kann erfindungsgemäß auch durch Wechselwirkung eines markierten Moleküls mit den Sonden-Molekülen erfolgen. Beispielsweise kann die Markierung durch Hybridisierung eines wie vorstehend beschrieben markierten Oligonukleotids mit einer Oligonukleotid-Sonde bzw. einem Oligonukleotid-Target

25 erfolgen.

Weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Markierungsverfahren und Nachweissysteme sind beispielsweise in Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik,

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998, Kapitel 23.3 und 23.4 beschrieben.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden

5 Nachweisverfahren eingesetzt, die im Ergebnis ein Addukt mit einem bestimmten Löslichkeitsprodukt, das eine Präzipitation zur Folge hat, liefern. Zur Markierung werden insbesondere Substrate eingesetzt, die in ein schwer lösliches, üblicherweise gefärbtes Produkt umgesetzt werden können. Beispielsweise können bei dieser Markierungsreaktion Enzyme verwendet werden, die den Umsatz eines Substrats in

10 ein schwer lösliches Produkt katalysieren. Reaktionen, die geeignet sind, um zu einem Niederschlag an Array-Elementen zu führen, sowie Möglichkeiten für die Detektion des Niederschlags sind beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 00/72018 und in der internationalen Patentanmeldung WO 02/02810 beschrieben, auf deren Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen

15 wird.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die gebundenen Targets mit einer Markierung versehen, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwer löslichen Niederschlag auf dem

20 Array-Element katalysiert, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat bzw. die als Kristallisationskeim für die Umwandlung eines löslichen Substrats zu einem schwer löslichen Niederschlag auf dem Array-Element wirkt, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat.

25 Der Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens erlaubt auf diese Weise die simultane qualitative und quantitative Analyse einer Vielzahl von Sonden/Target-Wechselwirkungen, wobei einzelne Array-Elemente mit einer Größe von  $\leq 1000 \mu\text{m}$ ,

vorzugsweise von  $\leq 100 \mu\text{m}$  und besonders bevorzugt von  $\leq 50 \mu\text{m}$  realisiert werden können.

In der Immunzytochemie und bei immunologischen Mikrotiterplatten-basierten Tests

5 ist der Einsatz von enzymatischen Markierungen bekannt (siehe E. Lidell und I. Weeks, *Antibody Technology*, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995). So katalysieren beispielsweise Enzyme den Umsatz eines Substrats in ein schwerlösliches, in aller Regel gefärbtes Produkt.

10 Eine weitere Möglichkeit des Nachweises molekularer Wechselwirkungen auf Arrays besteht im Einsatz von Metallmarkierungen. Hierbei werden beispielsweise kolloidales Gold oder definierte Goldcluster mit den Targets gekoppelt, ggf. über bestimmte Vermittlermoleküle wie Streptavidin. Die durch die Goldmarkierung entstehende Färbung wird vorzugsweise durch nachfolgende Reaktion mit unedleren

15 Metallen wie z.B. Silber verstärkt, wobei die mit den Targets gekoppelte Goldmarkierung als Kristallisationskeim bzw. Katalysator beispielsweise für die Reduktion von Silberionen zu einem Silberniederschlag wirkt. Die mit Goldmarkierungen gekoppelten Targets werden im Folgenden auch als Goldkonjugate bezeichnet.

20

Bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auch eine relative Quantifizierung der Sonden-/Target-Wechselwirkung erfolgen. Die relative Quantifizierung der Konzentration der gebundenen Targets auf einem Sonden-Array durch Nachweis eines Präzipitats bzw. eines Niederschlags erfolgt über die

25 Konzentration der mit den Targets gekoppelten Markierungen, die die Reaktion eines löslichen Substrats zu einem schwerlöslichen Niederschlag auf dem Array-Element, an dem eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden hat, katalysieren bzw. als Kristallisationskeim für derartige Reaktionen wirken. Beispielsweise beträgt im Fall

von mit Nanogold markierten HPLC-gereinigten Oligonukleotidsonden das Verhältnis von gebundenem Target zu Goldpartikel 1:1. In anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann es ein Vielfaches oder auch einen Bruchteil davon betragen.

5

Die Detektion bei dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erfolgt somit durch Messung der Transmissionsänderung, Reflexion oder Streuung, die durch den Niederschlag hervorgerufen wird, der auf den Array-Elementen, an denen eine Sonden/Target-Wechselwirkung stattgefunden 10 hat, durch die katalytische Wirkung der mit den gebundenen Targets gekoppelten Markierung erzeugt wird.

Die Lichtabsorption wird im Fall der Kopplung von kolloidalem Gold oder definierten Goldcluster mit den Targets bereits durch die Gegenwart dieser 15 metallischen Markierungen hervorgerufen. Zur Verstärkung der Lichtabsorption wird allerdings vorzugsweise katalytisch durch derartige Wechselwirkungshybride, d.h. die mit einer Markierung wie beispielsweise kolloidalem Gold oder definierten Goldclustern versehene Targets, ein nicht transparentes Präzipitat abgeschieden. Als 20 besonders vorteilhaft hat sich im Fall von Goldkonjugaten die Verwendung von Silber als Präzipitat herausgestellt.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird somit in Schritt c) der zeitliche Verlauf der Niederschlagsbildung an den Array-Elementen in Form von Signalintensitäten detektiert. Auf diese Weise 25 kann eine genaue Bestimmung der relativen quantitativen Menge an gebundenen Targets gewährleistet werden. Eine derartige Vorgehensweise ist ausführlich in der internationalen Patentanmeldung WO 02/02810 beschrieben, auf deren Inhalt hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

Bei einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Kits zur Durchführung der vorstehend beschriebenen Verfahren zur Verfügung gestellt. Die in diesen Kits enthaltenen Hybridisierungsanordnungen bzw. Chip-Vorrichtungen

5 sind z.B. in den internationalen Patentanmeldungen WO 03/059516, WO 01/02094 und WO 03/031063 beschrieben. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung bezüglich der Mikroarray-Anordnungen wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

10 Außer den dort beschriebenen Hybridisierungsanordnungen, vorzugsweise einem ArrayTube®, umfassen die Kits als wichtigen Bestandteil die erfindungsgemäße Microarray-Vorrichtung bzw den erfindungsgemäßen Biochip und insbesondere die vorstehend beschriebenen für die nachzuweisenden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme spezifischen Nukleinsäure-Sondenmoleküle, die auf dem Träger angeordnet

15 sind. Gegebenenfalls weiter enthalten sind entsprechende Primer, Hybridisierungspuffer und Konzentrate von entsprechenden Waschlösungen.

Das folgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken:

20 Beispiel

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ein Detektionsverfahren entwickelt, mit dem die Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* innerhalb von sechs Stunden, ausgehend von den Bakterien auf einer Agar-Platte, durchgeführt

25 werden kann. Hierzu werden nur grundlegende Labormethoden, wie z.B. PCR und Geräte, die zur Grundausrüstung eines molekularbiologischen Labors gehören, benötigt. Ein kritischer Schritt hierbei ist die PCR, bei der über 40 verschiedene Sequenzen im gleichen Reaktionsansatz parallel amplifiziert werden. Um dies zu

erreichen, wurden bei einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens 80 DNA-Primer so optimiert, dass sie in etwa gleiche Schmelzpunkte und Bindungskinetiken aufweisen. Weiterhin wurden die Template-Nukleinsäuren nur linear, d.h. auf einem DNA-Strang amplifiziert, um somit auch die Auswirkungen 5 geringer kinetischer Unterschiede zu minimieren. Diese Optimierung ermöglicht die Verwendung einer Multiplex-PCR zur Target-Amplifikation.

Mit dem im Rahmen der vorliegenden Erfindung bereitgestellten DNA-Chip ist es daher möglich, *Pseudomonas aeruginosa* schnell und einfach in einem 10 diagnostischen Routinelabor innerhalb eines Tages zu untersuchen und so z.B. bei Verdacht auf eine nosokomiale Ausbreitung dieses Erregers schnell reagieren zu können.

Im Folgenden ist ein Versuchsprotokoll angegeben:

15

a) Vorbereitung der Bakterien

2 Impfösen der Bakterienkultur (20 µl Bakterien von einer LB-Agarplatte) in 1,5 ml H<sub>2</sub>O aufnehmen

20 Zentrifugation (3.000 x g, 6 min)

Überstand abnehmen

Pellet 4 x waschen:

Resuspension in 5 mM EDTA

Zentrifugation (14.000 x g, 5 min)

25 Überstand abnehmen

Pellet in 50 µl dest. H<sub>2</sub>O resuspendieren

## b) Polymerase- Kettenreaktion (PCR )

Die zu untersuchenden DNA-Sequenzen der Bakterien werden in einer Polymerase-

5 Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

	Polymerase:	Terminator- Polymerase (New England Biolabs)
10	dNTPs:	je 2 mM dATP, dGTP, dCTP, 1,5 mM dTTP 0,5 mM Biotin-dUTP (Roche)
15	Primer: zu dem DNA- μmol/l. Die	Mischung aus je zwei 21 bp Oligonukleotiden für jede detektierende Sequenz. Die Primer haben gleiche Schmelzpunkte und Bindungskinetik und binden auf gleichen Strang ca. 100 Basen vor der untersuchten Sequenz. Die verwendete Mischung hat eine Gesamtkonzentration an Oligonukleotiden von 5 Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abbildung dargestellt.
20	17	
25	Reaktionsansatz:	10x Reaktionspuffer 2,5 μl dNTP- Mischung 2,5 μl Primer 2,5 μl DMSO 1,2 μl Bakterien-Suspension 8,0 μl Terminator-Polymerase 0,5 μl Wasser 7,8 μl

- 58 -

= 25  $\mu$ l

Reaktionsablauf:

	Start:	96°C	300 s
5	40 Zyklen	60°C	20 s
		72°C	40 s
		96°C	60 s
10	Ende	10°C	

c) Hybridisierungsassay

Die eingesetzten Oligonukleotid-Sonden sowie die Anordnung der Oligonukleotid-  
15 Sonden auf dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurechip sind in den Abbildungen 18  
bis 21 gezeigt.

Die Chips werden 2 x 5 Minuten mit 500  $\mu$ l des Hybridisierungspuffer (6 x SSPE /  
0,1%SDS/2% w/v Blocking Reagenz (Roche)) in einem Thermomixer gewaschen  
20 (30°C, 550 rpm).

20  $\mu$ l des PCR-Produkts werden zusammen mit 80  $\mu$ l Hybridisierungspuffer in einem  
Heizblock denaturiert (96°C, 5 min) und auf Eis abgekühlt.

25 Diese Sondenlösung wird auf den ArrayTube®-Chip (Clondiag) gegeben und eine  
Stunde bei 60 °C und 550 rpm inkubiert (Thermomixer).

Die Sondenlösung wird verworfen und der DNA-Chip gewaschen:

- 59 -

500 µl 2xSSC/0,01%Triton X-100 für 10 min bei 30°C und 550 rpm

500 µl 2xSSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

500 µl 0,2xSSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

5

Der ArrayTube®-Chip wird mit 100 µl Meerrettich-Streptavidin-Konjugat (1:100 Verdünnung) für 15 min (30°C, 550 rpm) inkubiert und anschließend gewaschen:

500 µl 2 x SSC/0,01%Triton X-100 für 10 min bei 30°C und 550 rpm

10 500 µl 2 x SSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

500 µl 0,2 x SSC für 10 min bei 20°C und 550 rpm

Zur Detektion werden 100 µl eines Tetramethylbenzidin-Derivats (Medac, Wedel, Deutschland) auf den Chip gegeben und das Ergebnis mit Hilfe eines AT-Readers

15 (Clondiag) und des Programms IconoClust (Clondiag) ausgewertet. Die Ergebnisse für diverse Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* sind in den Abbildungen 1 bis 15 dargestellt.

d) Lösungen

20

10x SSPE- Puffer 1,5 M NaCl

0,1 M Natriumphosphat

0,01M EDTA

pH 7,4

25

20x SSC- Puffer 3,0 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

- 60 -

pH 7,0

Abbildungen

Die Abbildungen 1 bis 15 zeigen hybridisierte DNA-Chips, die mit unterschiedlichen  
5 *P. aeruginosa*-Stämmen hybridisiert wurden. Die Aufarbeitung der Stämme erfolgte  
nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Abbildung 16 zeigt ein Laborreaktionsgefäß typischer Form und Größe.

10 Abbildung 17 zeigt die Nukleotidsequenzen der im Ausführungsbeispiel eingesetzten  
Primer.

15 Erfindungsgemäße Oligonukleotid-Sonden sowie die Anordnung der Oligonukleotid-  
Sonden auf dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurechip sind in den Abbildungen 18  
bis 21 gezeigt.

**Ansprüche**

1. Oligonukleotid zur Geno- und Pathotypisierung der Spezies  
*Pseudomonas aeruginosa* mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der  
5 Gruppe bestehend aus (sämtliche Sequenzen in 5' → 3'-Richtung):

i)

GAAGCCCAGCAATTGCGTGTTC  
GAAGCCCAGCAACTGCGTGTTC  
GGTGCTGCAGGGTGTTCGCCGG  
GGTGCTGCAGGGCGTTGCCGG  
CAAGATGCCGCAGCGGTCAAC  
CAAGATGCCGCTGCGGTCAAC  
TGCTGCTGGCGGCGGTGTGCTAT  
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCTAT  
CCTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG  
CTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG  
TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG  
CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG  
GC GGAAA ACTTCCTGCACATGATGTT  
GC GGAAA ACTTCCTCCACATGATGTT  
AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG  
AGCTCAGCAGACCGCTGACGAG  
AAGAGGACGGCCGCCGGTGACGCC  
AAGAGGACGGCCGCCAGGTGACGCC  
GACAAGATGCGCCTCGACGACC  
GACAAGATGCGTCTCGACGACCG  
AGCCGACCTACGCGCCGGCAG

CAGCCGACCTATGCGCCGGGCAG  
CCGTTCGAACGGCTCATGGAGCA  
GCCGTTCGAACGACTCATGGAGCA  
TGGAGCAGCAAGTGTTCGGC  
TGGAGCAGCAACTGTTCCCGGC  
GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG  
AACAAAGACCGGCTCCACCAACGG  
GCGACCTGGGCCTGGTGATCCT  
GCGACCTGGGACTGGTGATCCT  
GCCGACCAACTGAACCTCAACTCG  
GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA  
CAGCCTGCGGTATGTCCTCGG  
CGCCAGTTGAGAACGGAGTCACC  
GCGCGATCTTCTCCACTTCATCGG  
GCCTCCGCGATTGAACATCGTGAT  
GTAGCCGGAGTCGAGCGGAATCAT  
GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT  
CGAGGAGTTCGGACCCGCTTGA  
AATAGGACCGGCAGAACGGGCATT  
GCGCCTTCTCCTCTTGCAGATGT  
CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC  
GCATCATTGCGCGTCACATCTGGT  
TCTGAACTGCGGCTATCACCTGGA  
AATTGATGGCTTCTCAGGCGCAGG  
AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT  
TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG  
TGGTAGCTCTGACGTACTGGCTG  
CCCGTTGCTCATAACCCGTTCCCTG

AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG  
ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT  
AGCGTCCCTGACCAACCTCATCAG  
CGCCAACAATTGCCATTACAGCG  
TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG  
CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC  
AGCCCAGCAATTGCGTGTTCCTCCG  
AGCCCAGCAACTGCGTGTTCCTCC  
GCTGCTGGCGGCGGTGTGC  
TGCTGCTGGCAGCGGTGTGCT  
CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG  
GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG  
ACGGCCGCCGGGTGACGCC  
ACGGCCGCCAGGTGACGCCG  
GCCGACCTACGCGCCGGGC  
AGCCGACCTATGCGCCGGGCA  
GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA  
GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG  
CAGCCCAGTCAGGACGCGCA  
AGTGACGTGCGTTTCAGCAGTCCC  
GTGTCACGGCCCAGTGTCTAGCAGC  
CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC  
CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG  
CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG  
CCTGGACCTCTCCAAGGTTCGCCT  
GCCATTCCGACGACCAAAACAAGGC  
GTGCTGCAGGGTGTTCGCCG  
GCTGCAGGGCGTTCGCCG

CAAGATGCCGCAGCGGTCAACGAC  
CAAGATGCCGCTGCGGTCAACGAC  
GCTCAGCAGACTGCTGACGAGGCTAACG  
GCTCAGCAGACCGCTGACGAGGCTAAC  
CGACCTACGCGCCGGGCAG  
CGACCTATGCGCCGGGCAGC  
CGTTCGAACGGCTCATGGAGCAG  
CGTTCGAACGACTCATGGAGCAGC  
CGACCTGGGCCTGGTGATCCT  
GCGACCTGGGACTGGTGATCCTGG  
CAGTTGTCGCCAGGTCTGGAGAATCC  
CACATCAATGTCAGCCCACGCCA  
CTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTC  
ACGAGGGTGATGGCTGGGAATACG  
GCCAATTGGGTCAAGCAAGCAACG  
CGTGTGCGAACTCGCATGGC  
AGGCCATGGGCTAGCCGGATGC  
CGAAGCGTAGGGTCTCGTAGCC  
TGCGAGGACCAGAACCTTGATGG  
CGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTG  
CCTGAATCCGACCATTGCGAGTC  
TCGGACTGTACTCCTACGAAGCAGC  
CCAATCCCTATCGCTGGAACCGTACC  
GCTCGGGACTCGCATTGCGTCC  
GCGTTATTGCTCGGTCTCTCCTCG  
TGCATAGGAGTCATGCCGACAGCA  
GCCTGCCTACTTGTCCCCAACGC  
GGCTGTATTGCCCGCCATTCTCC

CGACAGACAGAAAGGGTTCTGCGC  
CACCATGCAAATGCTCGATGGACTGC  
GCAGGCGTCCAAGTTGGAGCTCTCC  
GGAACACAAACGTGGGGCGTGAC  
CCAGTTGGCACCACCATGCTTGC  
GACCGCAAGCAGAAACGGCATGC  
CCATGGTCGGAACAGGCACGATATGC  
CCACTCGATCATGTTGAGCATCGGCTCC  
GGTTAGTCCCTCTGCCCGCATCG

ii) Oligonukleotiden, die mit einem der Oligonukleotide unter i) in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80 % und besonders bevorzugt mindestens 90 %, 92 %, 94 %, 96 % der Basen übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* ermöglichen,

5 iii) Oligonukleotiden, die sich von einem der Oligonukleotide unter i) und ii) dadurch unterscheiden, dass sie um mindestens ein Nukleotid verlängert sind, und

iv) Oligonukleotiden, die mit einer Sequenz, die zu einem Oligonukleotid unter i), ii) und iii) komplementär ist, unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

10

2. Microarray-Vorrichtung, umfassend ein Trägerelement mit darauf auf vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

15

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung ein Reaktionsgefäß ist, welches eine für ein Laborreaktionsgefäß (Tube) typische Form und/oder typische Größe aufweist, und bei dem auf einer seiner Grundflächen ein Trägerelement mit darauf auf

vorbestimmten Bereichen immobilisierten Oligonukleotid-Sonden für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* angeordnet ist.

- 5        4.        Vorrichtung nach Anspruch 2 oder 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden derart ausgewählt sind,  
dass sie jeweils von 30% bis 70% der Population von Stämmen von *Pseudomonas*  
*aeruginosa* erfassen.
  
- 10        5.        Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für  
Nukleinsäuren, die eine Basensubstitution verglichen mit der Sequenz des  
Referenzstamms von *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen.
  
- 15        6.        Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für  
Nukleinsäuren, die in nur einem oder wenigen Stämmen der Spezies *Pseudomonas*  
*aeruginosa* vorkommen.
  
- 20        7.        Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für  
Nukleinsäuren, die in Pathogenitätsinseln im Genom von *Pseudomonas aeruginosa*  
vorliegen.
  
- 25        8.        Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für  
Nukleinsäuren, die in krankheitsassoziierten Genen wie *exoS* und *exoU* vorliegen.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden spezifisch sind für  
Nukleinsäuren, die in für Flagellen von *Pseudomonas aeruginosa* kodierenden  
Genen enthalten sind.

5

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotid-Sonden ausgewählt werden aus den  
Oligonukleotiden nach Anspruch 1.

10 11. Verfahren zum spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der  
Spezies *Pseudomonas aeruginosa* in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:  
a) Inkontaktbringen der Probe mit einem Nukleinsäure-Chip in einer Microarray-  
Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10; und  
b) Detektion der Wechselwirkung zwischen den Oligonukleotid-Sonden und in der  
15 Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren.

12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass die in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäuren vor  
der Detektion amplifiziert werden.

20

13. Verfahren nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels Multiplex-PCR erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13,  
25 dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation Primer eingesetzt werden, die  
ähnliche Schmelzpunkte und/oder ähnliche Bindungskinetiken aufweisen.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14,

dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation linear erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Primer ausgewählt werden mit einer  
5 Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus (sämtliche  
Sequenzen in 5' → 3'-Richtung):

ACGC GGAT GTCCTGGATTG  
CTGA AGAAGGGCGCTACGCG  
GCGT ACCGGCAAGGTGATAG  
10 CTCGGTGAAACATCGGGAGGG  
TCATCCAGCAAGCCATTGCGC  
GGAGTCGCTTCCGCCATCG  
TGGAGTCGCTTCCGCCATCG  
AAGGGCGTTCACGCTGACGC  
15 ATCCGGAAGGGCGTTCACG  
TCCACACCTCAGACTCGGCG  
TATTGACGACCTACCGCGCGC  
GCAACTGATGTTCGCCCAGC  
CGCAACTGATGTTCGCCCAGC  
20 ACACGCAACTGATGTTCGCCC  
TGTCCCGGCTCAGTTCAACG  
AACACCTTGGCGTTGTCCC  
GCAACACCTTGGCGTTGTCC  
TCAAGCTCGTTGTGGACCGC  
25 GTTACGACGGCGTGCTGTCGG  
ACGCAACGTATTGGCGACCC  
CGCAACGTATTGGCGACCC  
AGCTGATGGTATGCCCGTGC

CTAGTGATCGCACCGGAGCC  
AGCCTCGACACCGGTTCTCG  
TCGTTCATCCCCAGGCTTCG  
ACCATCTCGTTCATCCCCAGG  
5 TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG  
TCGACGCGACGGTTCTGAGCC  
TGACGTTCTGCCGGTAGCG  
CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG  
CAGTAGCGGTACCGGTCTGC  
10 TTCCTCGCCGGCATAGTAGGC  
CGAGGACGAGGCATCTTCCGG  
GCAGGTAGCAGGTTCCAGG  
AACTGTTCTTCTGCGCGGGCG  
TGATCGGCTTGGCTCGCAGG  
15 GCTGATCGGCTTGGTCTCGC  
GAGGC GTTCTGCTCGTGGTCG  
TTTTCCAGCATGCGCAGGG  
GCTGGCTTTCCAGCATGCG  
TTGCGGCTGGCTTTCCAGC  
20 TTGGGATAGTTGCGGTTGGC  
CGTAGGCGATCTCACCCGC  
TGGCGTAGGCGATCTCACCC  
GGCGAGATAGCCGAACAGGC  
GCGGCGAGATAGCCGAACAGG  
25 CACTTGCTGCTCCATGAGCC  
GAGGTCGAGCAGGCTGATGC  
TAGGTCGCGAGGTCGAGCAGG  
GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

CGCATCTTGTCTGGTCAGG  
TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC  
ACGTCGAGGTGGTCTGTCG  
GTAGCCTCGGCATCCAGCG  
5 TCGGCATTGGGATAGTTGCGG  
CCTCCTGTCTCATGCCGATGC  
GCATTGCCACGGAAGGAAGG  
GAAGGCATCATGGCATTGCC  
GTCATGGGTTTCCCAGAGACC  
10 GATCGCGATGTCGACGGTGCC  
CGATCGCGATGTCGACGGTGC  
TGCCGATCGCGATGTCGACG  
GACGAATAACCAGCTGCGTGG  
GCAGACGAATAACCAGCTGCG  
15 CGCGACGTCGTGACGTCAGC  
ACTTCGGCTCTCGGGCTGG  
AGGTAGAGACTCGGGGAAACC  
TCGTTTCGGTCATGGCCAGG  
TTCCCGCGACGAACATCCGTGG  
20 CGCTTCCCGCGACGAACATCCG  
GGATCGCTTCCGATAGGGCAGC  
AGAGGCATGGGTCTGTACCG  
TCTGTCAATCCCCCTTGGGG  
AGCCCCCTTCTGTCAATCCCC  
25 GGCTTCCTACCGAAGGTCAAGG  
TGAGGGCTTCCTACCGAAGG  
TTCAAGGTCAAGGGCAATGCC  
AGTCCCTTCAAGGTCAAGGGC

GCCGACTGAGCTGTAGCTCGG  
GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG  
ACCAGACTGGTCAATGGTGG  
CCCGTGTTCCTCGTAGACCTTGC  
5 AGCAGTTACCCACAGCATGG  
CAGCAGTTACCCACAGCATGG  
CTACACTCCAACCGCTGGTCC  
GACCTACACTCCAACCGCTGG  
TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC  
10 TAATAGGCGAGCCTGCCGTCC  
TCCACGCCGAGGGACGTGCC  
GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC  
CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC  
CCAATGCCAGGGCCAGCGGA  
15 CGCTGGCAGTTCCGCTGGCC  
CAGGGTCGCCAGCTCGCTGCC  
AGGGTCGCCAGCTCGCTGC  
AGTGATCTGCCGCCGCGCTGCC  
GTGATCTGCCGCCGCGCTGCC  
20 GTTCCACAGGCGCTGCCGCC  
GTTCCACAGGCGCTGCCGCC  
CAAAGCCCCTGGTCGCCGCC  
GCAGCTTTCCACCGCCGCCGG  
AAACTGCCCGCCCCCATCC  
25 GGAAAAAACTGCCCGCCCCCCC  
ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG  
GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC  
GGGGTCGAGACGTGTACATGG

TTCCTGGGCCAGAGTTGGACC  
AGCTTAAGGCCGTGGCACTCG  
CCGGAGAATTCGCGTCCACC  
TGCTGACGATGAAGCCCCAGC  
5 AGGAGGCCGATGACAACACCC  
TGCCGATTCCATGCTCACGCC  
ACGACGTCACCGTCGAGACCG  
ACCGCCTTCTGGTGAGCTGG  
AGCCAAGACGGTTGTCGCGG  
10 TCAATGACGCCGAGTTGGCGC  
CTCGGACAGGTTCACGCTGG  
GCCATTGCTGCAACACCTCC  
GCGCGCGTTGAGAAACAGG  
CGGAGGTTGAAAAGCTGGCCC  
15 ATGCCATCGTTGAAGGCACCGC  
TGCCATCGTTGAAGGCACCG  
TCTGGCGGAATCAGGTAGGCC  
CTTCCGGGGAGAAACCACCG  
ACCTCCAGCACCGACACACC  
20 ATCCGATCCACCTCCAGCACC  
CGTTCAGGTCGTAGACCGCGC  
GCGATACCAACTGTCCTGCGGC  
TGCCGAAGGTGAATGGCTTGCC  
CCTGATGGTCCGATCCCAGC  
25 GCCGAGGGTCAAGAACCACTGG  
TCTTGGCCCAGTCATAGCGGC  
TAACCCCCAAGGCCATTGGAGG  
GCCACCGCCTCGAATAACCCC

AATTGCTCGAGGGATGCGGC  
GGTCGAAACGGATGCGCAGG  
GCCCGCGTCATTTCACGTCG  
AATGCTCTGGGCAACGAGCC  
5 CTACCCAGCTTGGCGTAGC  
AAGCGATAGCCGTGCTCCTGC  
CCGGCTATATCCGCGGCTACC  
ATTGGCGCTGCTGTTACGCC  
GGTGGCGTCGGGTTTTCTGC  
10 AGGTCGTAGCGGAAGGTGGTGG  
ATCTGAACCGAGGGGATCCGC  
CCCGGGAGTCATTGGTCTGG  
GCCTGTTGGACCCCTTGACC  
TACTCCTGCCTGTTGGACCCC  
15 CGCTCAAGCGCTATCCCACC  
CGCCATCGGCCTGTACAACG  
CGGTAGAGAGCTGGGTTGGC  
AACCTGGAGCTAGGGCAGAGC  
GGTGCCTGACCCAAGCATCG  
20 TCCTTGAGTTCCCTGGCGCGG  
CAACACGCGACTGGCGATCC  
TACATCATCCGCAACGGCGGC  
TATTGACGACCTACCGCGCGCC  
CACCAAGAACCCGCTGCTCG  
25 ATCGTGGCAGGATGTCCACCG  
TAGGCGGGCCTTTGAAGGTGC

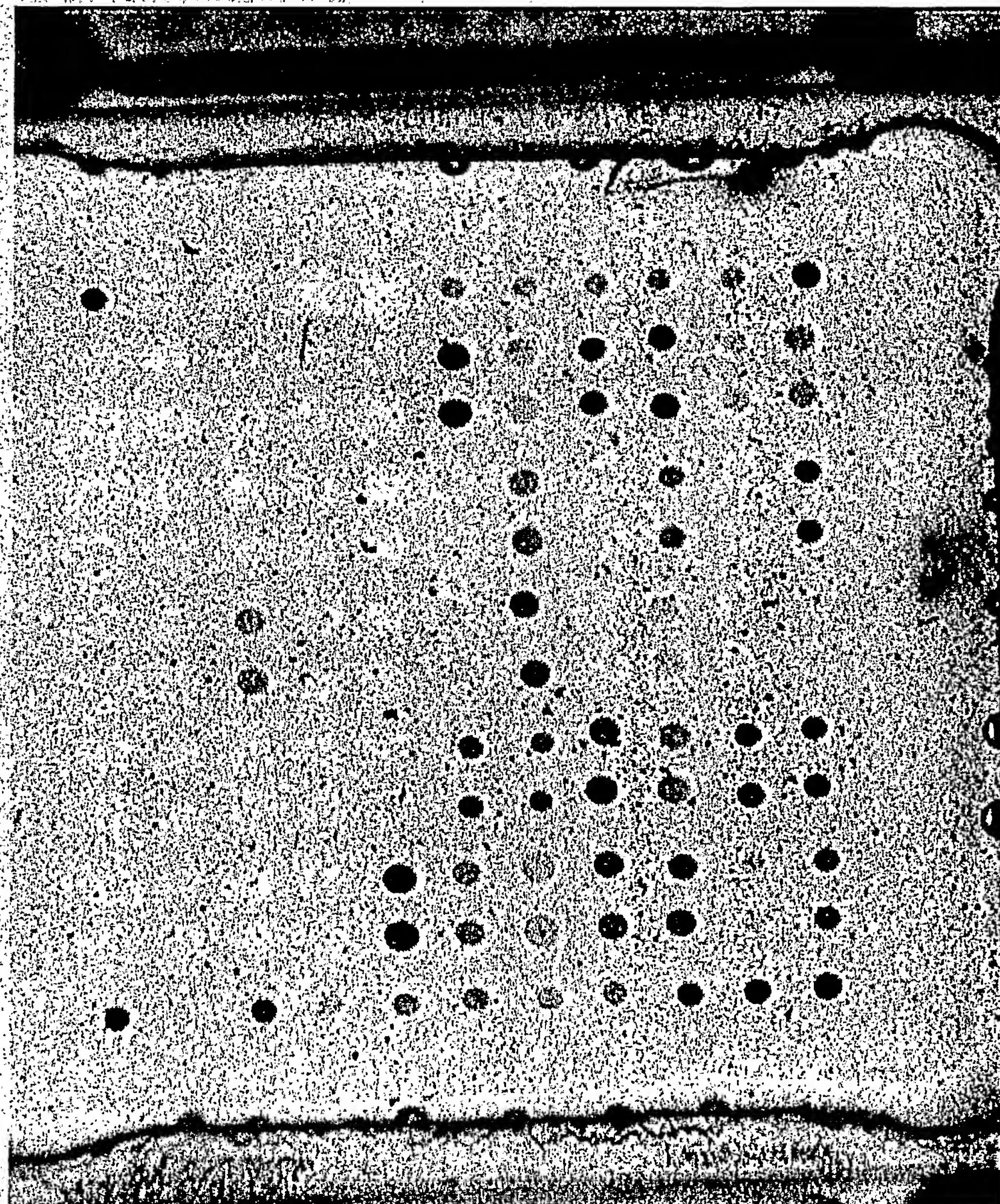
17. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 für den spezifischen Nachweis von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

5 18. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 bzw. der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10 bzw. des Verfahrens nach einem der Ansprüche 11 bis 16 zur Geno- und Pathotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa*.

10 19. Verwendung der Primer gemäß Anspruch 16 zur Amplifikation von Nukleinsäuren von Bakterienstämmen der Spezies *Pseudomonas aeruginosa*.

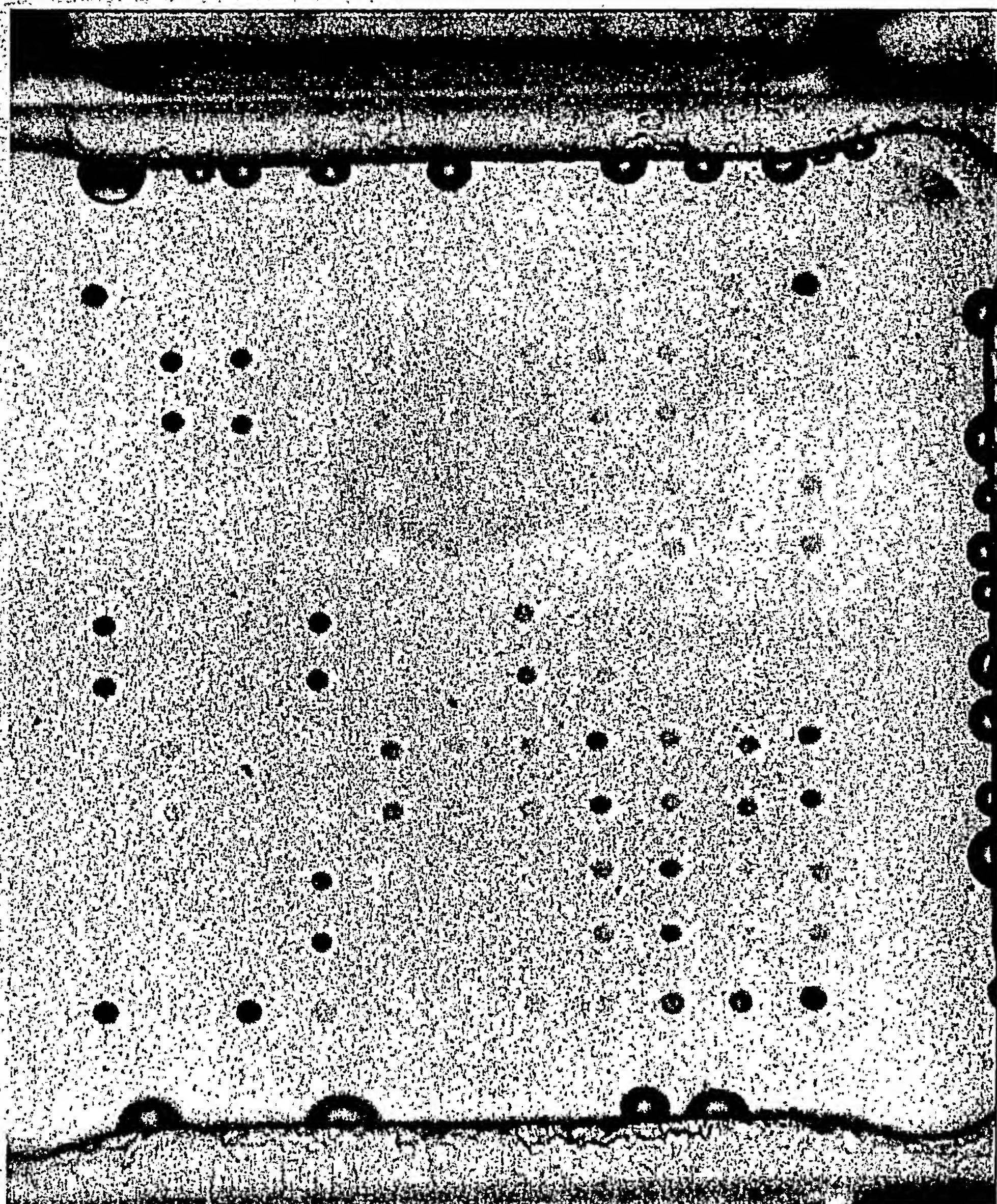
ABB. 1

*P. aeruginosa* AT-**Chip**



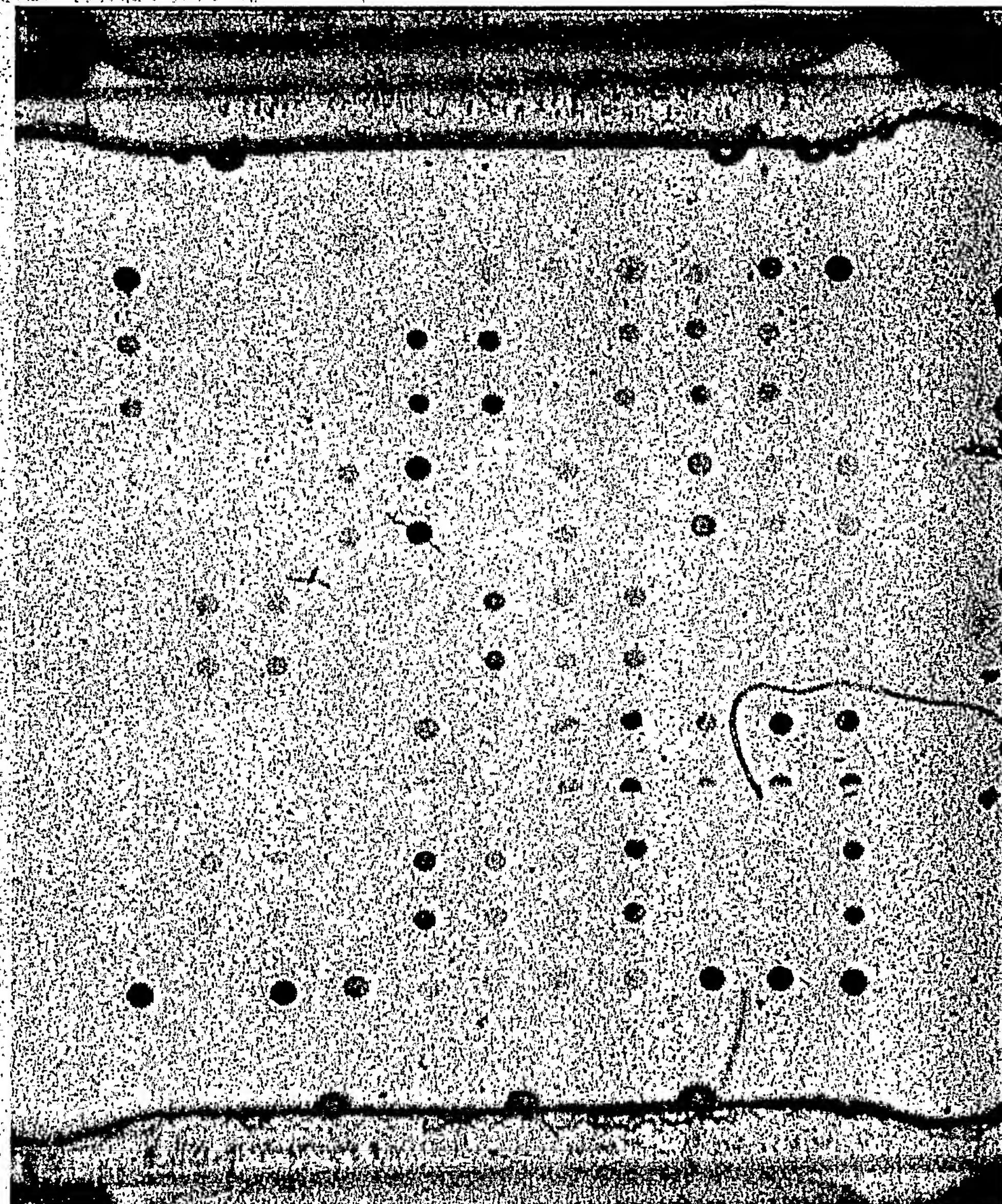
ZW117

*P. aeruginosa* AT-Chip



RP17

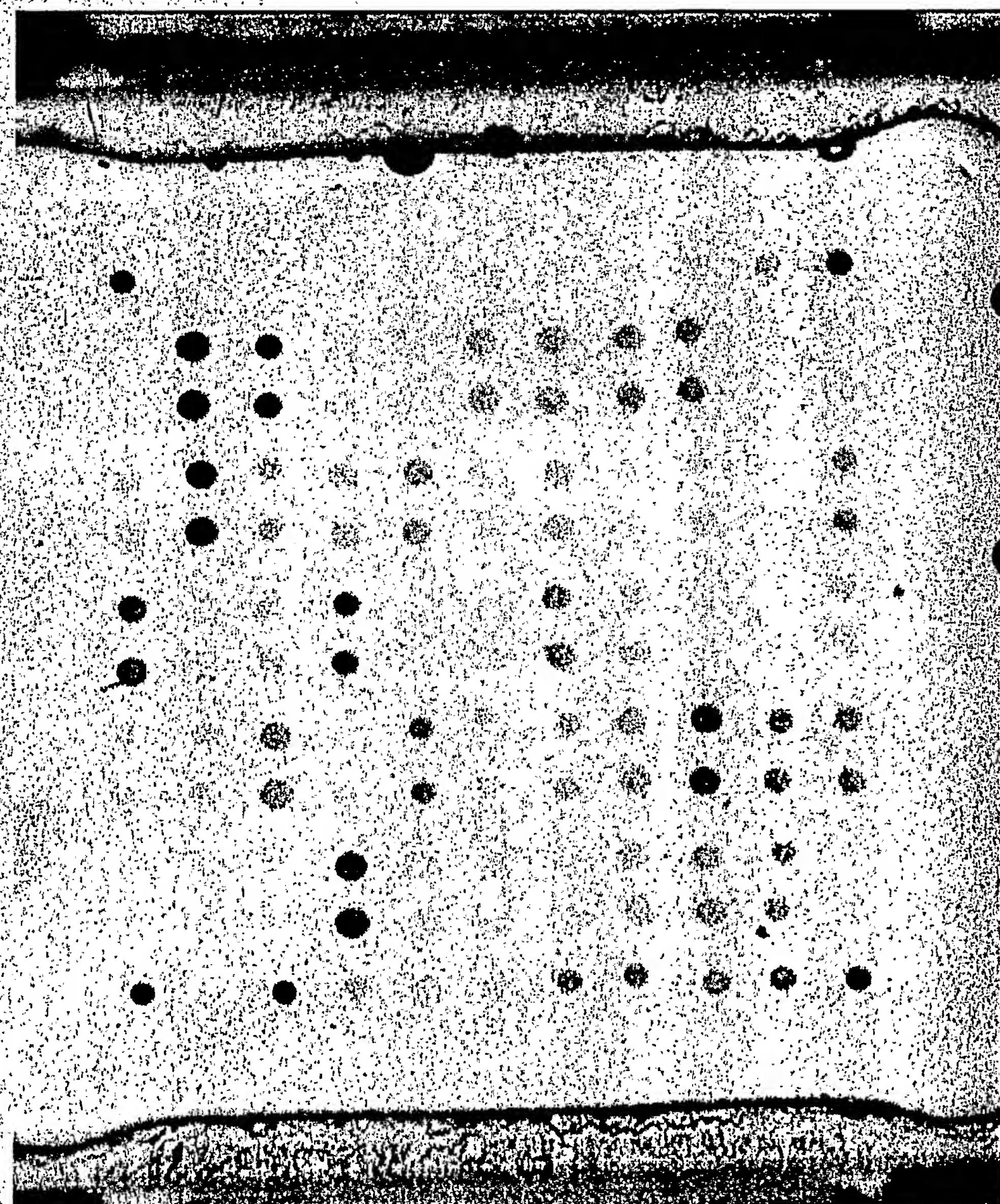
*P. aeruginosa* AT-Chip



TB

# *P. aeruginosa* AT-Chip

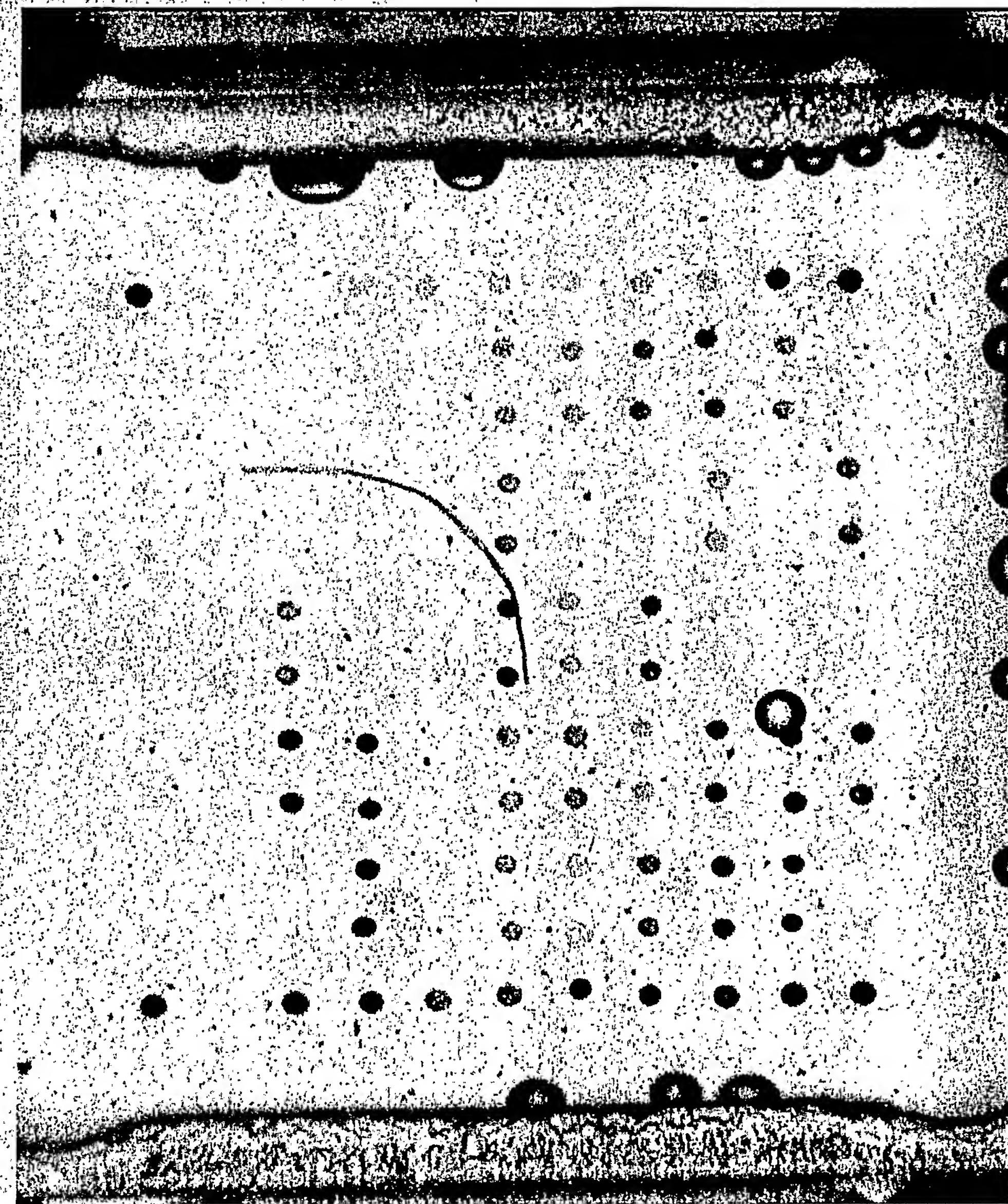
Abb.4



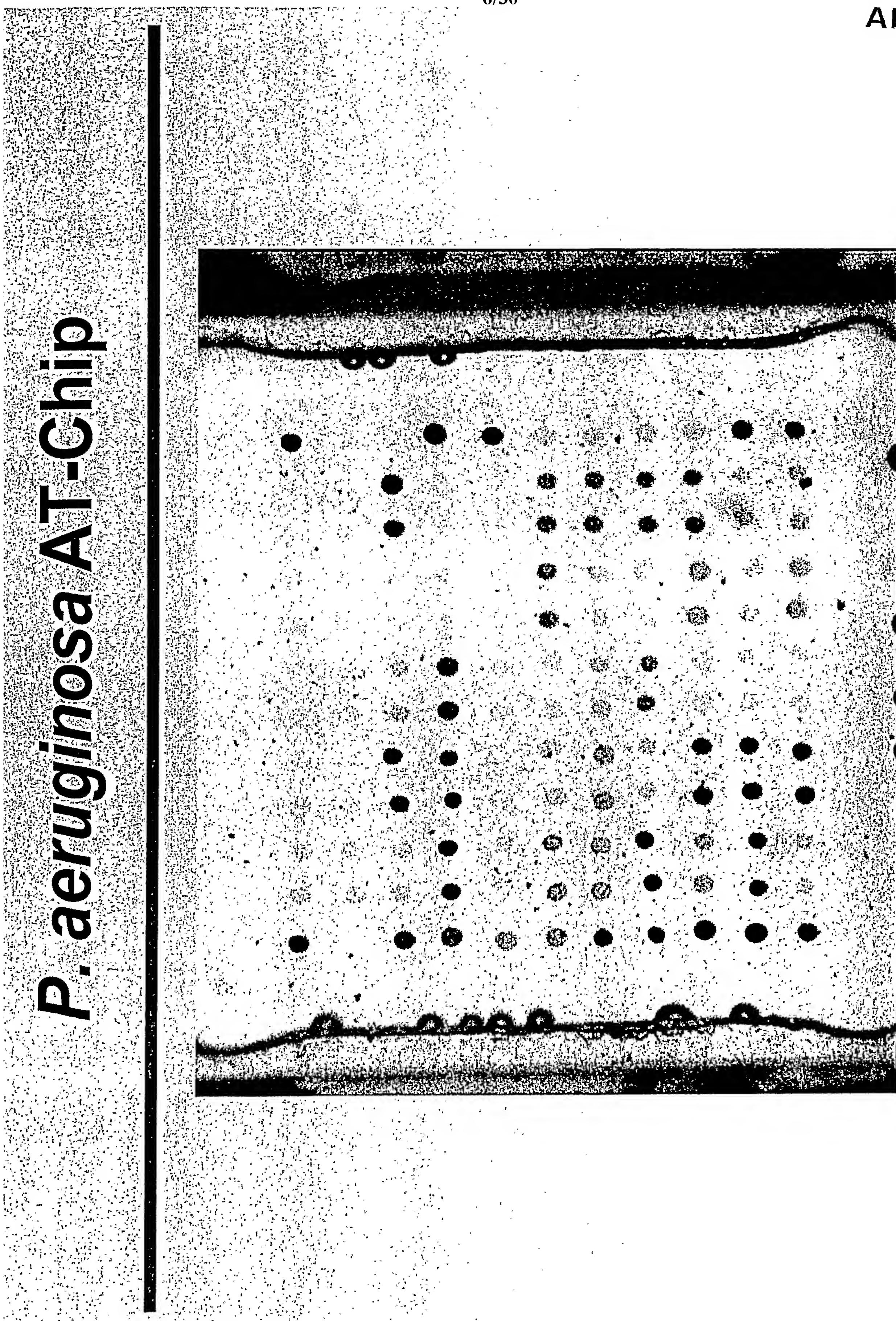
SG17M

Abb.5

*P.aeruginosa* AT-Chip

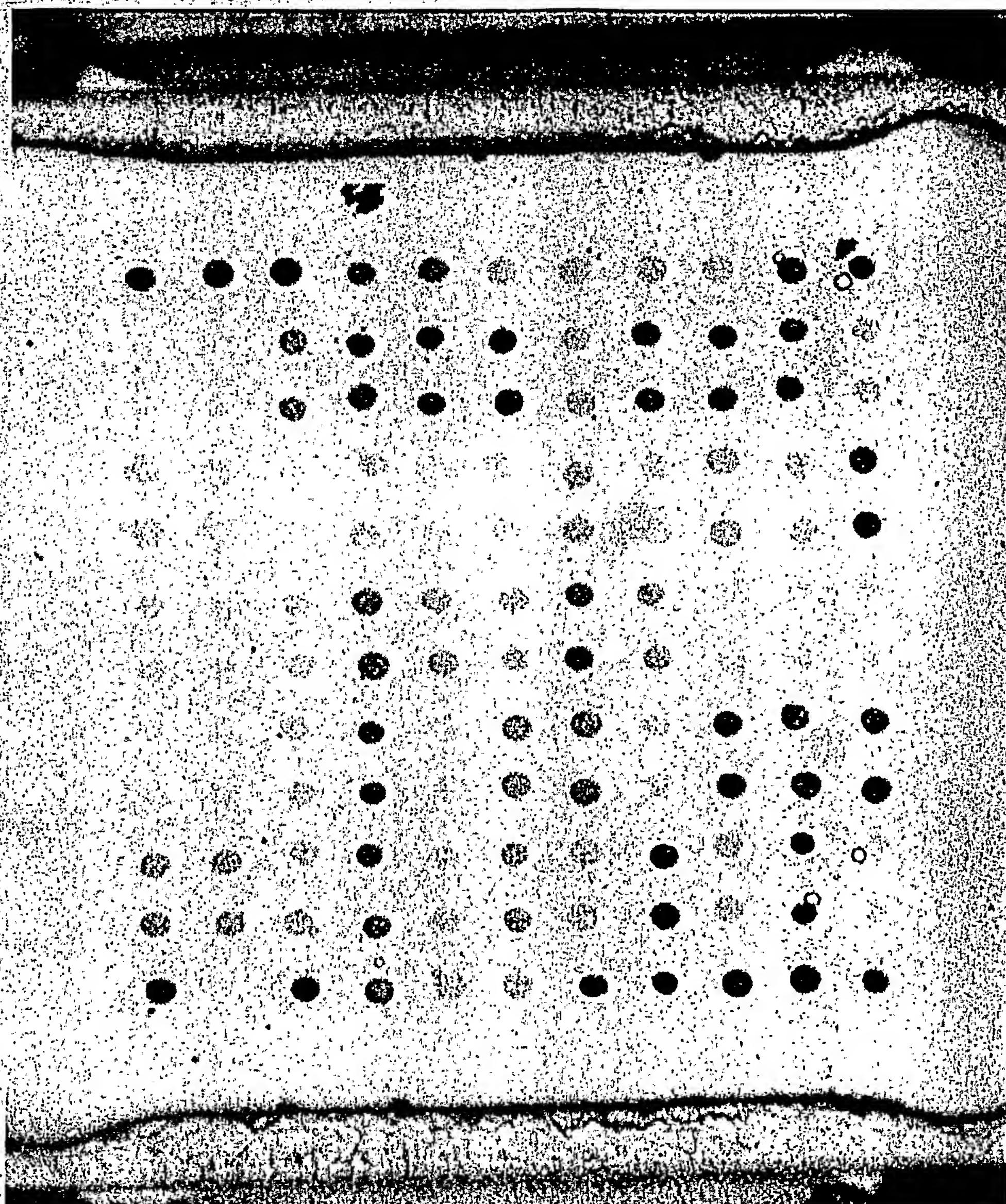


BST85



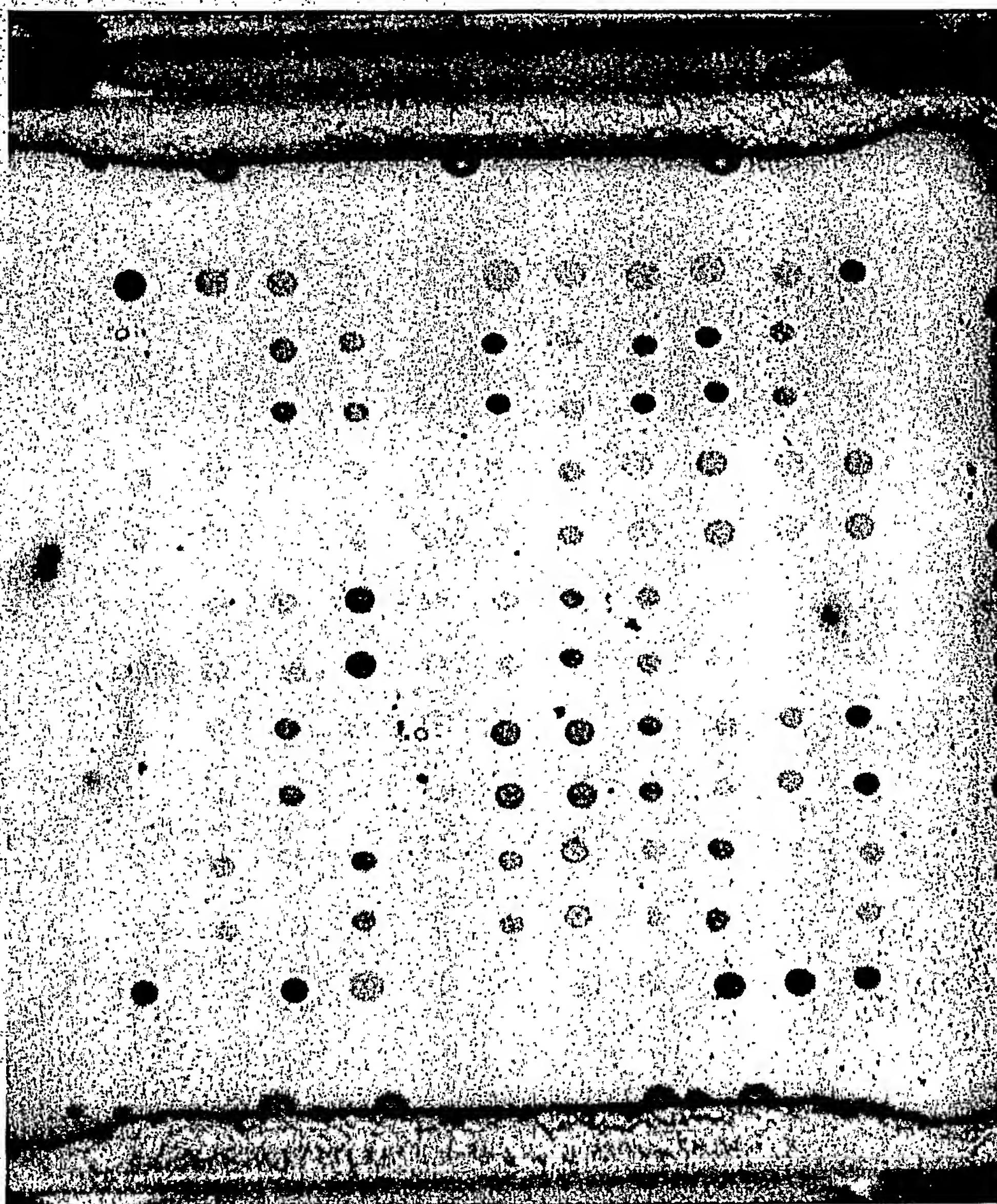
AL5846

*P. aeruginosa* AT-Chip



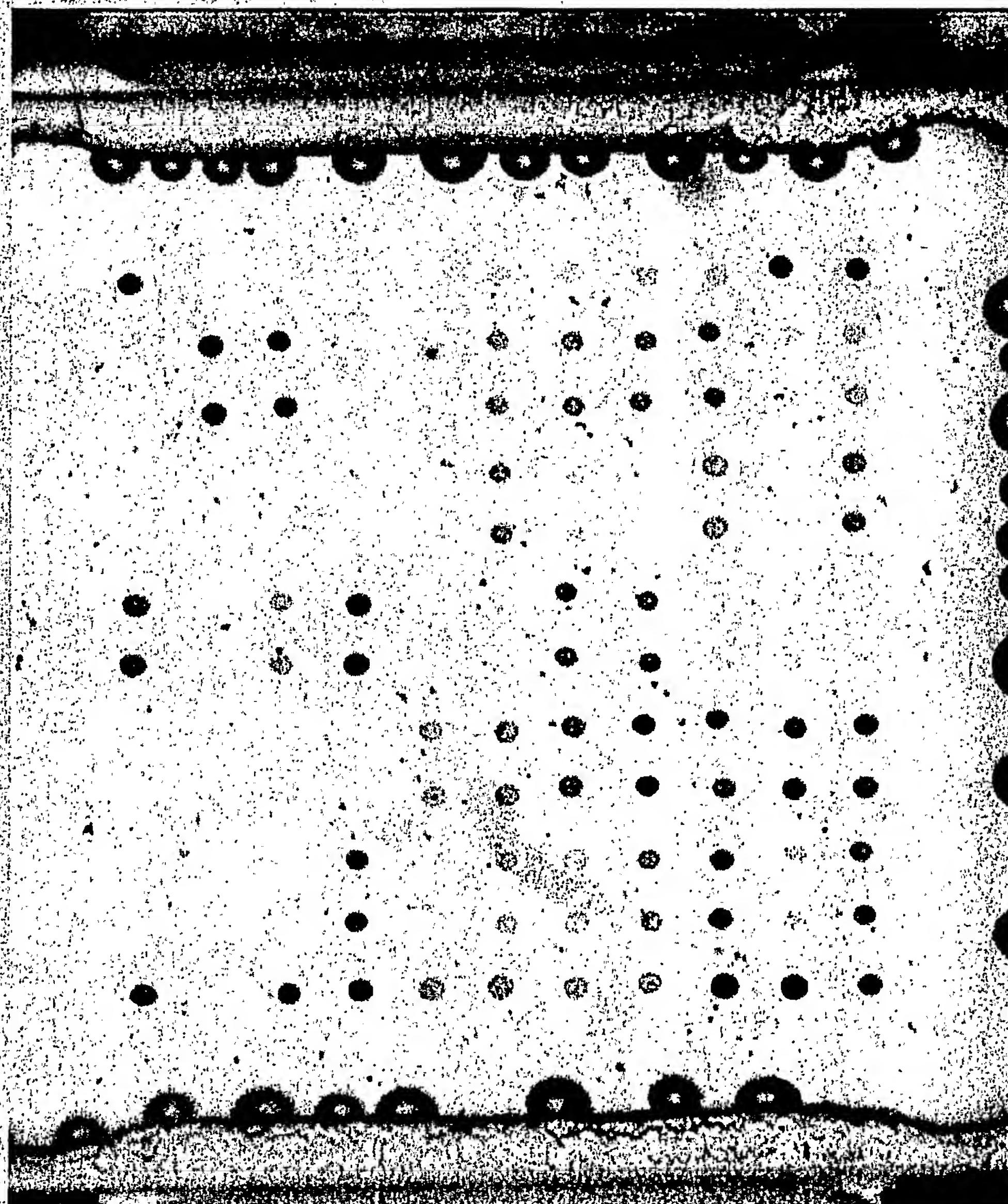
PT12

***P. aeruginosa* AT-Chip**



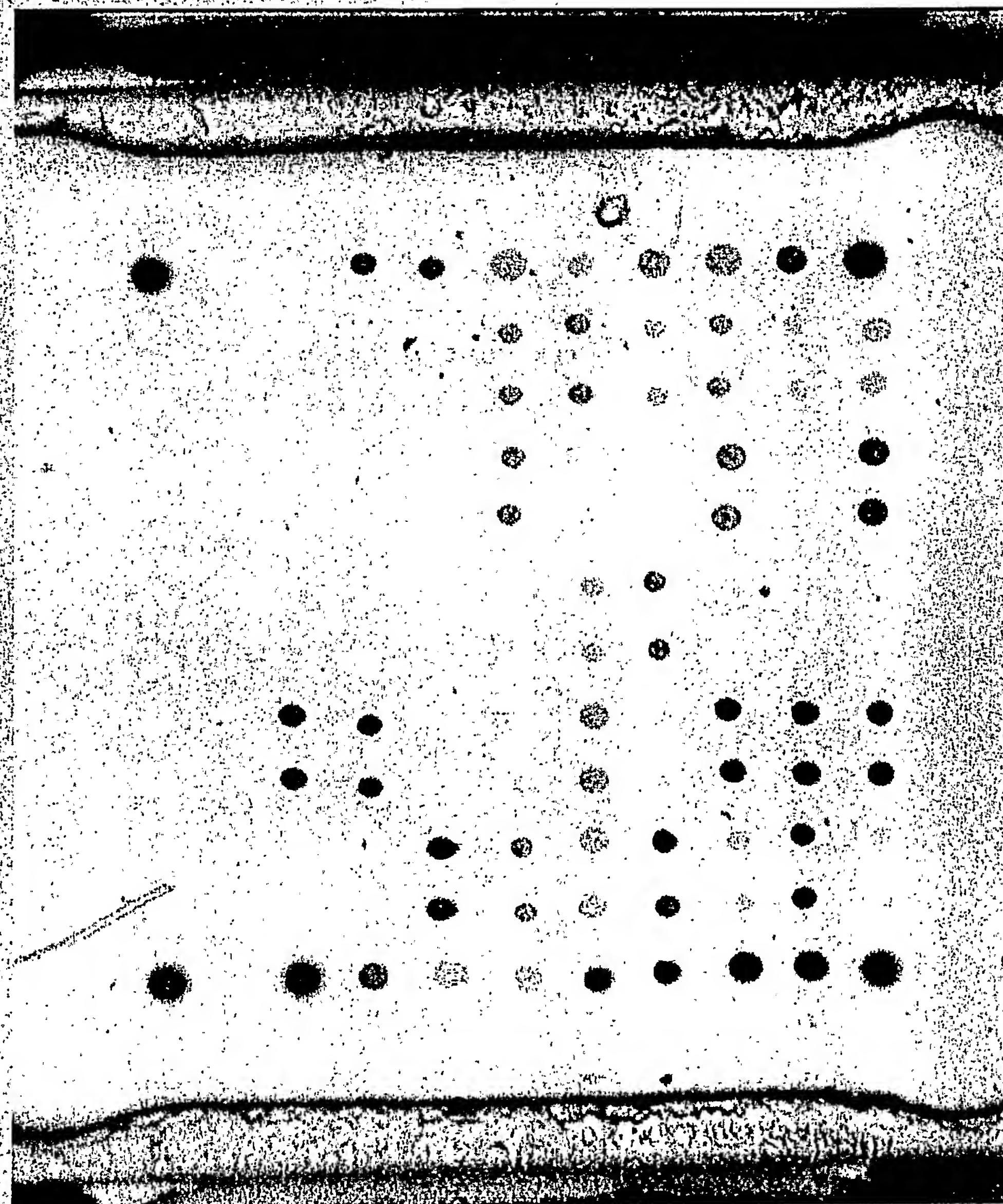
PT20

*P. aeruginosa* AT-Chip



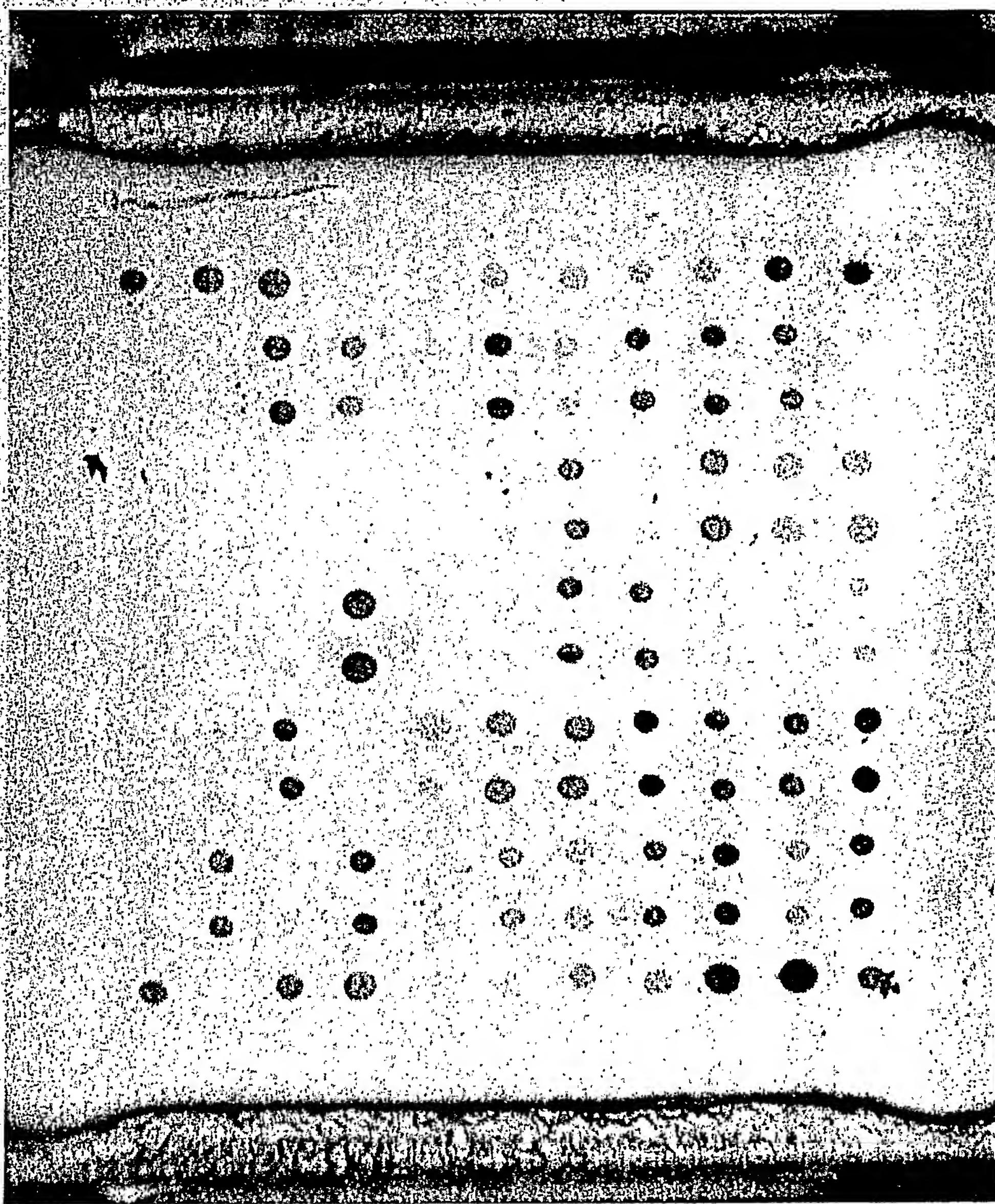
ZW79

*P. aeruginosa* AT-Chip



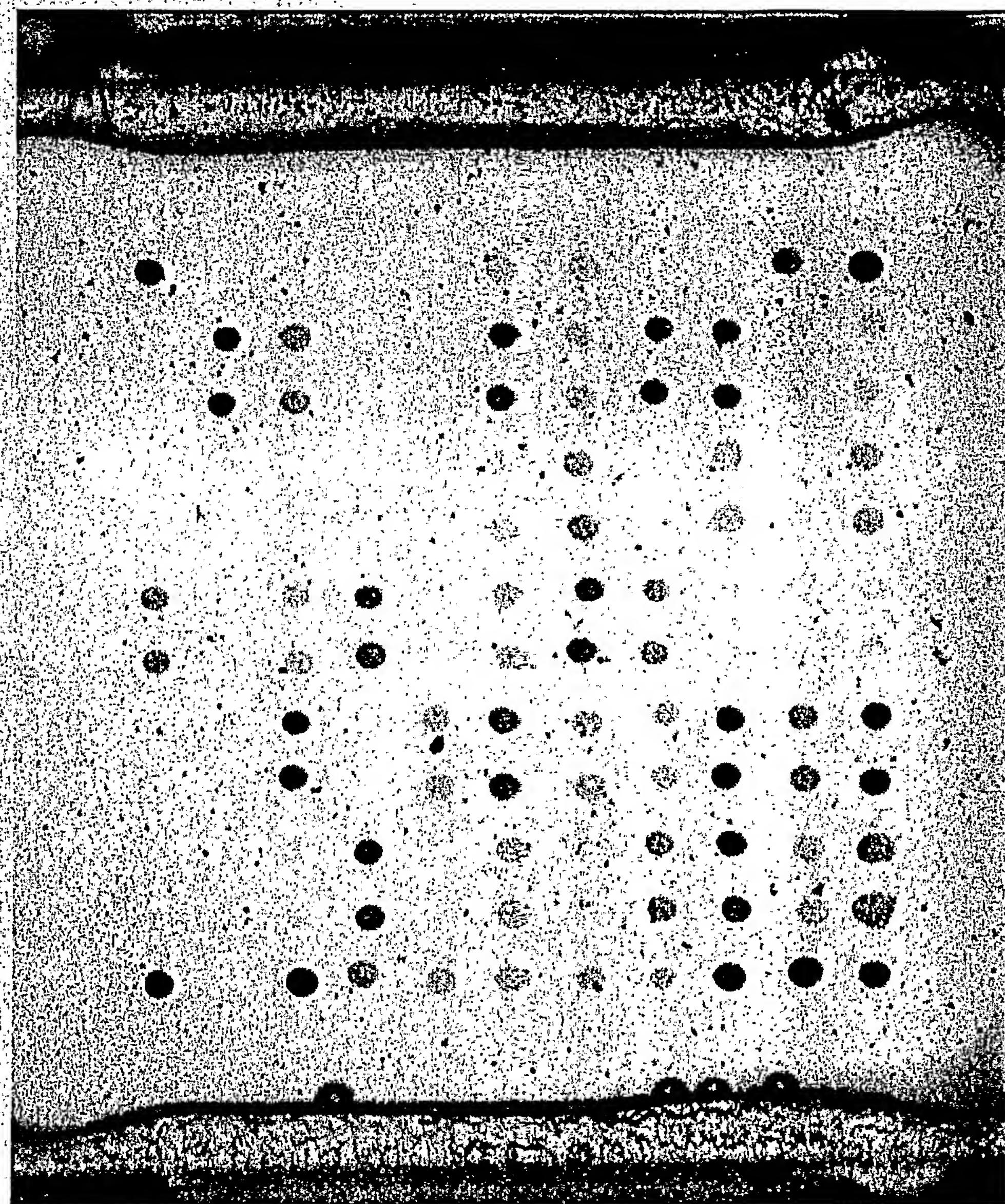
ZW85

*P.aeruginosa* AT-Chip



2813A

**P. aeruginosa AT-Chip**

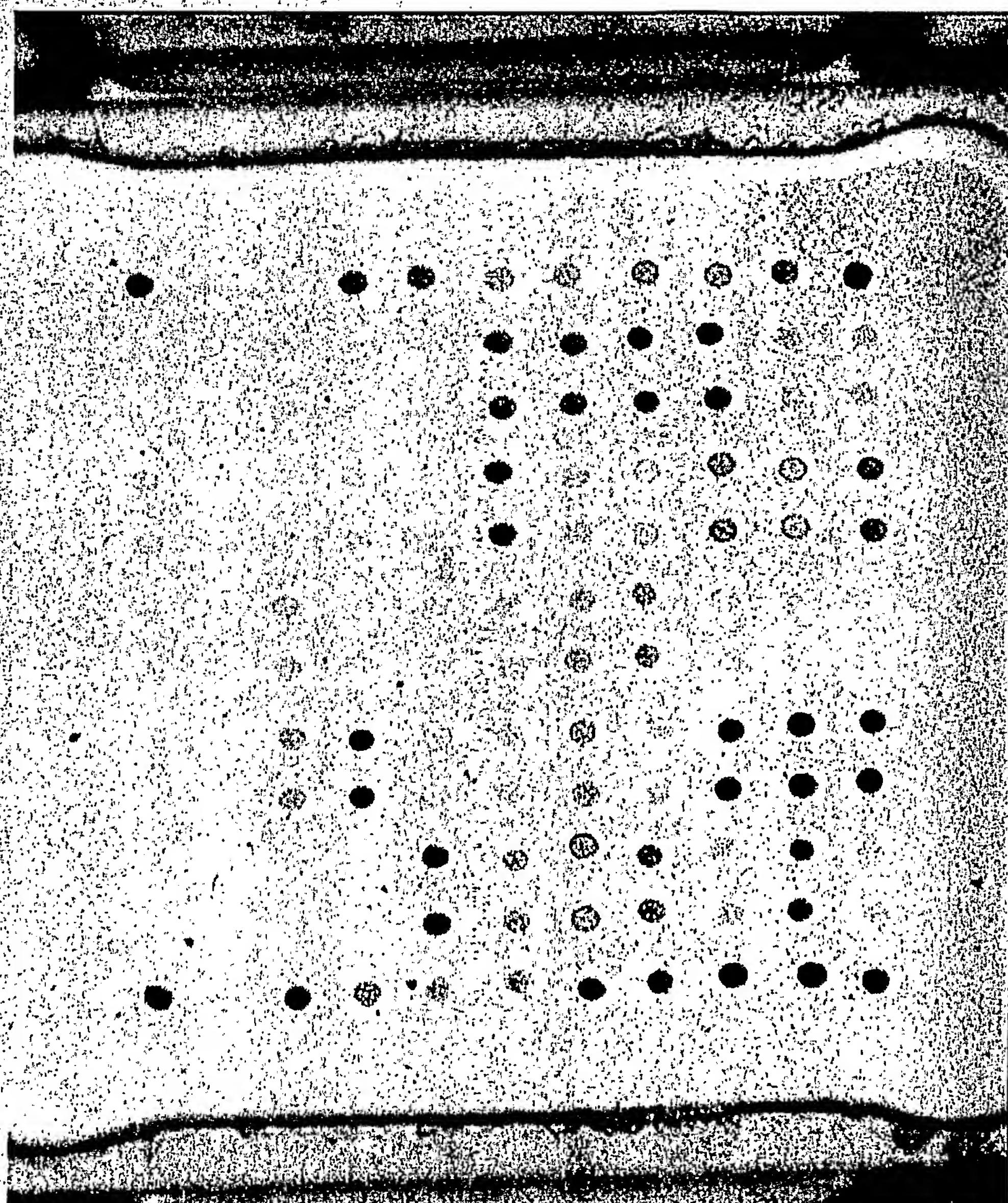


KB1-85

Abb.13

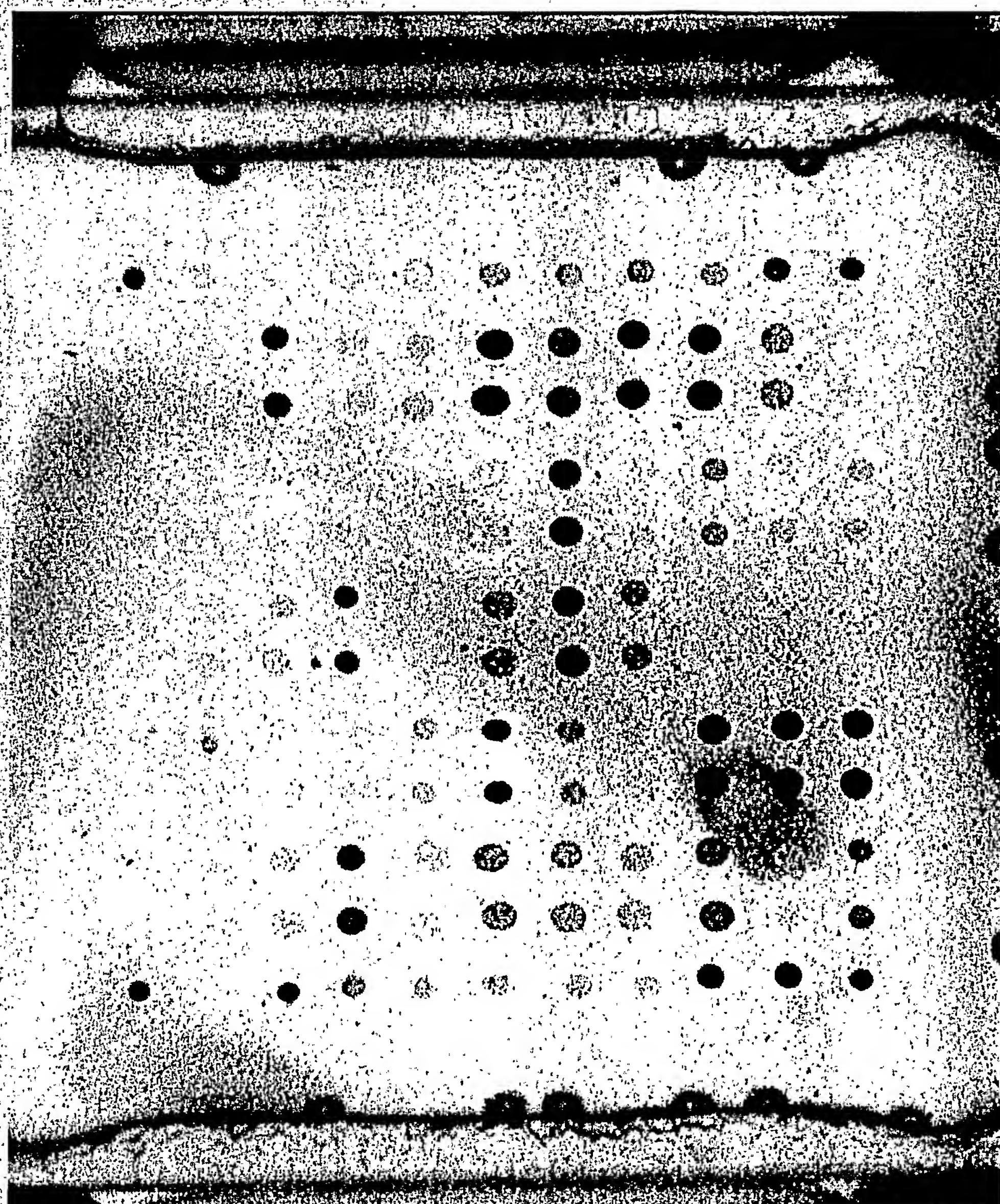
*P. aeruginosa* AT-Chip

ZW98



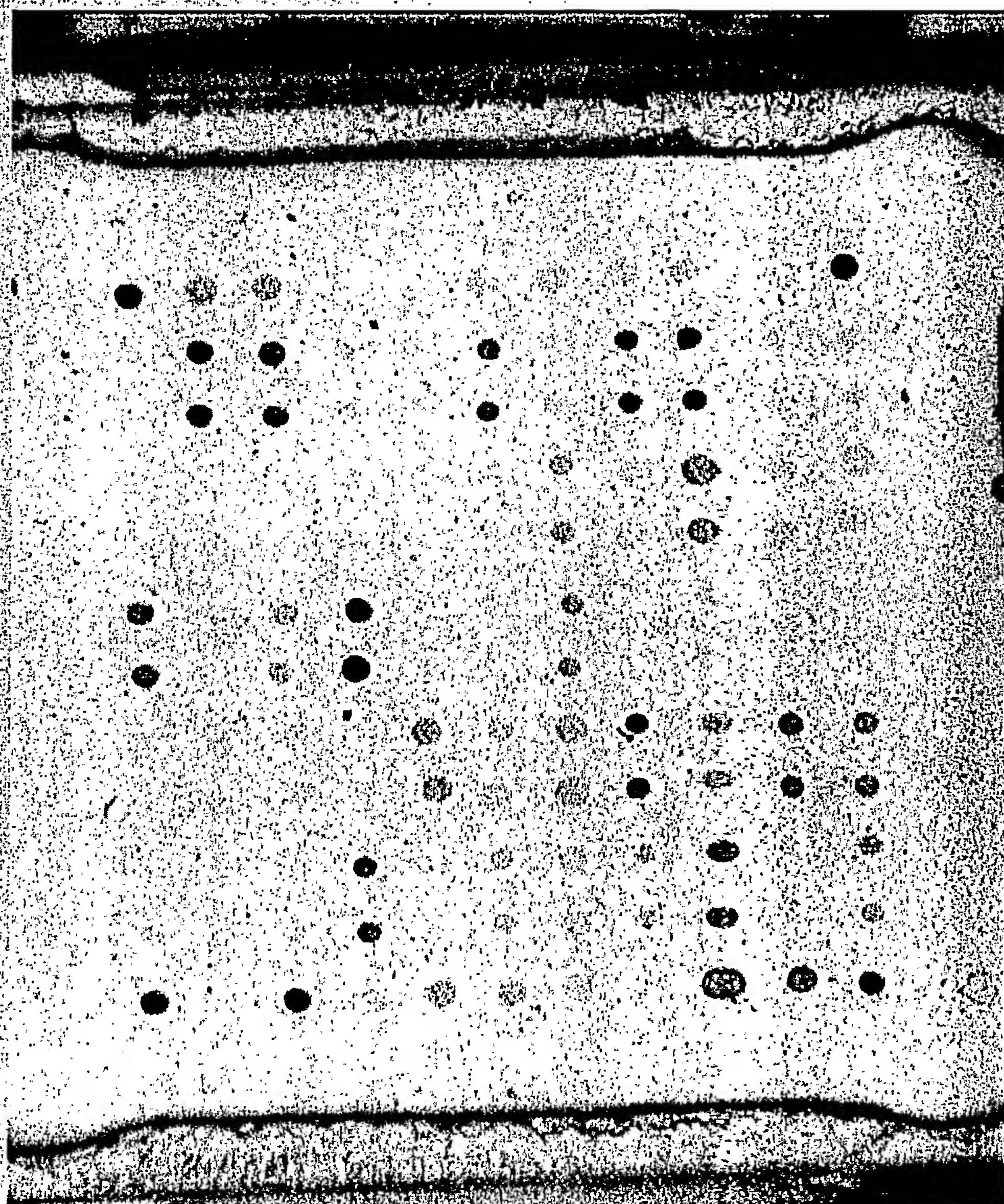
**Abb.14**

***P. aeruginosa* AT-Chip**



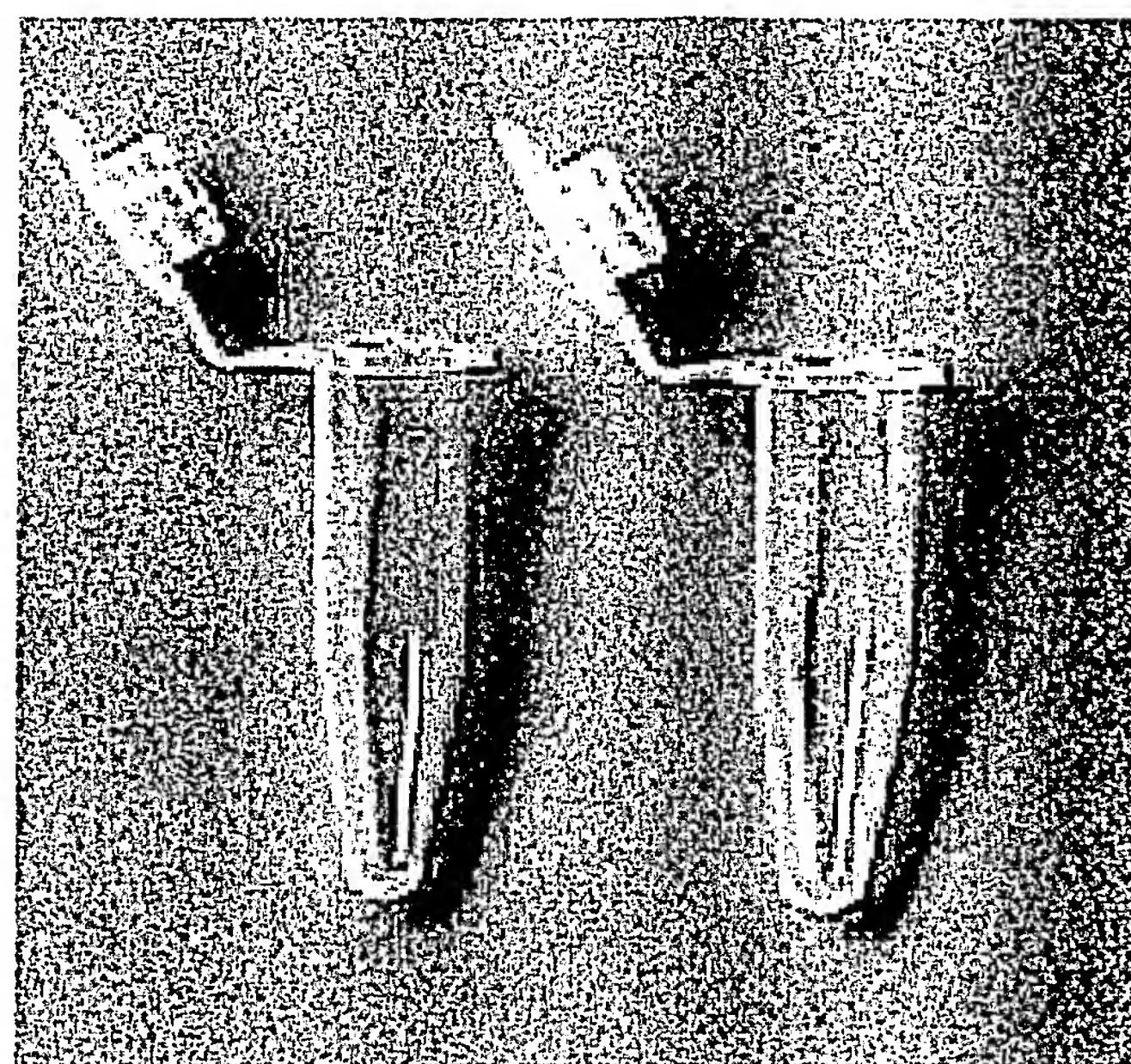
**641HD**

*P.aeruginosa* AT-**Chip**



ATCC15522

**Abb.16**



**Abb.17a**

47-1/23  
ACGCGGATGTCCTGGATTGG

47-1/39  
CTGAAGAAGGGCGCTACGCG

47-2/22  
GCGTACCGGGCAAGGTGATAG

47-2/52  
CTCGGTGAAACATCGGGAGGG

C45/18  
TCATCCAGCAAGCCATTGCGC

C45/60a  
GGAGTCGCTTCCGCCATCG

C45/60b  
TGGAGTCGCTTCCGCCATCG

C46/15  
AAGGGCGTTTCACGCTGACGC

C46/22  
ATCCGGAAGGGCGTTTCACG

C46/88  
TCCACACCTCAGACTCGGCG

C47-1/43  
TATTGACGACCTACCGCGCGC

C47-2/56a  
GCAACTGATGTTGCCAGC

C47-2/56b  
CGCAACTGATGTTGCCAGC

C47-2/59  
ACACGCAACTGATGTTGCC

CIS-4/36  
TGTCCCGGCTCAGTTAACG

CIS-4/50  
AACACCTGGCGTTGTCCC

CIS-4/51  
GCAACACCTGGCGTTGTCC

CIS-5/4  
TCAAGCTCGTTGTGGACCGC

CIS-5/48  
GTTACGACGGCGTGCTGTCGG

CSP-1/39a  
ACGCAACGTATTGGCGACCC

CSP-1/39b  
CGCAACGTATTGGCGACCC

fliAT/28  
AGCTGATGGTATGCCGTGCG

fliAT/72  
CTAGTGATCGCACCGGAGCC

oriC/20  
AGCCTCGACACCGGTTCTCG

oriC/54  
TCGTTCATCCCCAGGCTTCG

oriC/59  
ACCATCTCGTTCATCCCCAGG

oprL/53  
TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG

oprL/65  
TCGACGCGACGGTTCTGAGCC

fliCb/36  
TGACGTTCTGCCGGTAGCG

fliCb/65  
CAGTAGCGGTACCGGTCTGCG

fliCb/66  
CAGTAGCGGTACCGGTCTGC

alkAG/27  
TTCCTGCCGGCATAGTAGGC

alkGA/32

alkGA/51  
CGAGGACGAGGCATCTTCCGG

citAG/4  
GCAGGTAGCAGGTTCCAGG

citAG/46  
AACTGTTCTTCTGCGCGGCG

citGC/8  
TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG

citGC/11  
GCTGATCGGCTTGGTCTCGC

citGC/75  
GAGGCAGTCTGCTCGTGGTCG

oprI/12  
TTTTCCAGCATGCCAGGG

oprI/17  
GCTGGCTTTCCAGCATGCG

oprI/22  
TTGCGGCTGGCTTTCCAGC

## Abb.17b

**Abb.17c**

am7CA/1  
TTGGGATAGTTGCGGGTTGGC

am7CA/27  
CGTAGGCGATCTCACCCGC

am7CA/29  
TGGCGTAGGCGATCTCACCC

am3CT/21  
GGCGAGATAGCCGAACAGGC

am3CT/22  
GC GGCGAGATAGCCGAACAGG

am3CT/69  
CACTTGCTGCTCCATGAGCC

am2CT/35  
GAGGTCGAGCAGGCTGATGC

am2CT/42  
TAGGTCGCGAGGTGAGCAGG

am2CT/92  
GTCCTTCTGCACCGAGTCGG

am1GA/49  
CGCATCTTGTCTGGGTCAAGG

am1GA/58  
TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC

am45/1  
ACGTCGAGGTGGGTCTGTTCG

am45/96  
GTAGCCTTCGGCATCCAGCG

am6TC/60  
TCGGCATTGGGATAGTTGCGG

GI11/15  
CCTCCTGTCTCATGCCGATGC

GI11/59  
GCATTCGCCACGGAAGGAAGG

GI11/71  
GAAGGCATCATGGCATTGCC

GI18/62  
GTCATGGGGTTTCCCAGAGACC

fliCa/41  
GATCGCGATGTCGACGGTGCC

fliCa/42  
CGATCGCGATGTCGACGGTG

fliCa/46  
TGCCGATCGCGATGTCGACG

**Abb.17d**

SG-1/40  
GACGAATACCCAGCTGCGTGG

SG-1/43  
GCAGACGAATACCCAGCTGCG

SG-4/1  
CGCGACGTCGTGACGTCAGC

SG-4/67  
ACTTCGGCTCTCGGGCTGG

TB46/21  
AGGTAGAGACTCGGGGAAACC

TB46/45  
TCGTTTCGGTCATGCCAGG

TB471/22  
TTCCCGCGACGAACATCCGTGG

TB471/25  
CGCTTCCCGCGACGAACATCCG

TB472/36  
GGATCGCTTCCGATAGGGCAGC

TB472/84  
AGAGGCATGGGTCTGTACCG

TB473/34  
TCTGTCAATCCCCTTGGGG

TB473/41  
AGCCCCTTCTGTCAATCCCC

TB474/36  
GGCTTCCTACCGAAGGTCAAGG

TB474/41  
TGAGGGCTTCCTACCGAAGG

exoS/31  
TTCAAGGTCAATGGCAATGCC

exoS/37  
AGTCCCTTCAAGGTCAATGGGC

exoU/22  
GCCGACTGAGCTGTAGCTCGG

exoU/23  
GGCCGACTGAGCTGTAGCTCG

exoU/42  
ACCAGACTGGTCAATGGTGG

flins/2  
CCCGTGTTCCTAGACCTTGC

pKL11/49a  
AGCAGTTACCCACAGCATGG

**Abb.17e**

pKL11/49b  
CAGCAGTTACCCACAGCATGG

pKL3/47  
CTACACTCCAACCGCTGGTCC

pKL3/50  
GACCTACACTCCAACCGCTGG

pKL3/80  
TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC

pKL7/14  
TAATAGGCGAGCCTGCCGTCC

47D7nw1a  
TCCACGCCGAGGGACGTGCC

47D7nw1b  
GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC

C46-nw1a  
CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC

C46-nw1b  
CCAATGCCAGGGCCAGCGGA

C46-nw1c  
CGCTGGCAGTTCCGCTGGCC

ExoSnw1a  
CAGGGTCGCCAGCTCGCTGCC

ExoSnw1b  
AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC

ExoUnw1a  
AGTGATCTGCCGCGGCCCTGCC

ExoUnw1b  
GTGATCTGCCGCGGCCCTGC

OrfA-1  
GTTCCACAGGCGCTGCGGCCG

OrfA-2  
GTTCCACAGGCGCTGCGGCCG

OrfA-3  
CAAAGCCCCCTGGTCGCGCGG

OrfC-1  
GCAGCTTTCCACCGCCGGCGG

OrfI-1  
AAACTGCCCGCCCCCATCC

OrfI-2  
GGAAAAACTGCCCGCCCCCCC

OrfJ-1  
ACGCTCGCAGCGCCTCACGCG

OrfJ-2

GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC

**Abb.17f**

no	tube	name	5'-3'-sequence	group	length	[%]	Tm [°C]	GC-content	spot-ID's
1	Pa-S_001	oriC_T-C_wt	GAAGCCCCAGCAAATTGGCTGTTC	1	23	52,2	62,4	2,3	2,3
2	Pa-S_056	oriC_T-C_mut_1	GAAGCCCAGCAAATTGGCTGTTC	1	23	56,5	64,2	14,15	
3	Pa-S_057	oprL_T-C_wt_1	GGTGCTGCAGGGTGTTCGCCGG	1	23	69,6	69,6	4,5	
4	Pa-S_058	oprL_T-C_mut_1	GGTGCTGCAGGGTGTTCGCCGG	1	23	73,9	71,3	16,17	
5	Pa-S_059	fliC_a_A-T_wt_1	CAAGATCGCCGGCAGGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	6,7	
6	Pa-S_060	fliC_a_A-T_mut_1	CAAGATCGCCGGCAGGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	18,19	
7	Pa-S_061	alkB2_G-A_wt_1	TGCTGCTGGGGGGTGTGCAT	1	23	65,2	67,8	8,9	
8	Pa-S_062	alkB2_G-A_mut_1	TGCTGCTGGCAGGGTGTGCAT	1	23	60,9	66,0	20,21	
9	Pa-S_063	alkB2_A-G_wt_1	CCTGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG	1	25	72,0	72,8	10,11	
10	Pa-S_064	alkB2_A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG	1	24	75,0	73,0	22,23	
11	Pa-S_065	citS_A-G_wt_1	TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG	1	24	54,2	64,4	26,27	
12	Pa-S_066	citS_A-G_mut_1	CGAGCAAACCTCCACATGATGTT	1	23	60,9	66,0	38,39	
13	Pa-S_067	citS_G-C_wt_1	CGGGAAAACCTCCCTGCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	28,29	
14	Pa-S_068	citS_G-C_mut_1	CGGGAAAACCTCCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	40,41	
15	Pa-S_069	oprL_T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGGAG	1	23	60,9	66,0	30,31	
16	Pa-S_070	oprL_T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCGCTGACGGAG	1	22	63,6	65,8	42,43	
17	Pa-S_071	ampC_1_G-A_wt_1	AAGAGGACGGCCGGGGTGACGCC	1	25	76,0	74,5	32,33	
18	Pa-S_072	ampC_1_G_mut_1	AAGAGGACGGCCGGGGTGACGCC	1	26	73,1	74,3	44,45	
19	Pa-S_019	ampC_2_C-T_wt	GACAAGATGGCCTCGACGCC	1	22	63,6	65,8	34,35	
20	Pa-S_073	ampC_2_C_T_mut_1	GACAAGATGGCCTCGACGCC	1	23	60,9	66,0	46,47	
21	Pa-S_021	ampC_3_C-T_wt	AGCCGACCTACGGGGGGCAG	1	22	77,3	71,4	50,51	
22	Pa-S_074	ampC_3_C_T_mut_1	AGCCGACCTATGCCGGGCAG	1	23	73,9	71,3	62,63	
23	Pa-S_075	ampC_4_G-A_wt_1	CCGTTCGAACGGCTCATGGAGCA	1	23	60,9	66,0	52,53	
24	Pa-S_076	ampC_4_G_A_mut_1	CCGTTCGAACGGACTCATGGAGCA	1	24	58,3	66,1	64,65	
25	Pa-S_077	ampC_5_G-C_wt_1	TGGAGCAGCAAGTGTCCCCGGC	1	22	63,6	65,8	54,55	

Abb.18a

		ampC_5_G- C_mut_1	ampC_6_T-C_Wt- ampC_6_T-	ampC_6_T- C_mut_1	ampC_7_C-A_Wt- ampC_7_C-	ampC_7_C- A_mut_1	ampC_7_G- fliC b	TGGAGCAGCAACTGTTCGGC GAACAAGACGGGTTCCACCAACGG	1	22	63,6	65,8	66,67
26	Pa-S_078								1	24	58,3	66,1	56,57
27	Pa-S_027	ampC_6_T-C_Wt							1	24	58,3	66,1	56,57
28	Pa-S_079	C_mut_1							1	23	60,9	66,0	68,69
29	Pa-S_029	ampC_7_C-A_Wt							1	22	68,2	67,7	58,59
30	Pa-S_080							GGCAGACTGGGACTGGTGATCCT	1	22	63,6	65,8	70,71
31	Pa-S_031							GCCGACCAACTGAACCTCCAACTCG	2	24	58,3	66,1	74,75
32	Pa-S_032	fliC a						GTCGCTGAACGGCACCTACTTCA	2	23	56,5	64,2	86,87
33	Pa-S_033	exoS-1						CAGCCTGGGTATGCCCTCGG	3	22	68,2	67,7	76,77
34	Pa-S_034	exoU						CGCCAGTTGAGAACGGGAGTCACC	3	24	58,3	66,1	88,89
35	Pa-S_038	C-47-1						GGCGGATCTTCTCCACCTCATCGG	4	24	54,2	64,4	78,79
36	Pa-S_039	C-47-2						GCCTCCCGCGATTGAACATCGTGAT	4	24	58,3	66,1	90,91
37	Pa-S_040	47D7-1						GTAGGCCGGAGTCGAGGGAAATCAT	5	24	54,2	64,4	80,81
38	Pa-S_041	47D7-2						GTGAGCATGGAATCGGCAGTCGTT	5	24	58,3	66,1	92,93
39	Pa-S_054	C-45						CGAGGAGTTGGACCCGGCTTGA	6	24	54,2	64,4	82,83
40	Pa-S_055	C-46						AATAGACCCGAGAACGGGATT	6	24	58,3	66,1	94,95
41	Pa-S_035	C-InselSpez.-4						GCGCCTTCTCTCTTGCAGATGT	7	24	54,2	64,4	98,99
42	Pa-S_036	C-InselSpez.-5						CAGTATGGTACGGACACGAAGGCC	7	24	58,3	66,1	110,111
43	Pa-S_037	C-spezifisch-1						GCATCATGGCGTACATCTGGT	8	24	58,3	66,1	122,123
44	Pa-S_044	pKL-3						TCTGAACTGGGCTATCACCTGGA	9	24	54,2	64,4	100,101
45	Pa-S_045	pKL-7						AATTGATGGCTTCTCAGGGCGAGG	9	24	54,2	64,4	112,113
46	Pa-S_046	pKL-11						AGTCATGGGACTGAATAACGGCGACT	9	25	52,0	64,6	124,125
47	Pa-S_042	PAGI-1-1						TTCTCGGTGTCGGGGATTCTCGG	10	24	58,3	66,1	102,103
48	Pa-S_043	PAGI-1-8						TGGTAGCTCTCAGCTACTGGCTG	10	24	58,3	66,1	114,115
49	Pa-S_047	SG17M-1						CCCGTTGCTCATACCCGTTCTCG	11	24	58,3	66,1	104,105
50	Pa-S_048	SG17M-4						AGGGCATTCTCAGGTGGACTCAGG	11	24	54,2	64,4	116,117
51	Pa-S_053	fla-insel-1						ACCTGTGGCTGGAGGTATGTT	12	24	58,3	66,1	106,107
52	Pa-S_049	TB-C47-1						AGCGTCCCTGACCAAGCTCATCAG	13	24	58,3	66,1	118,119
53	Pa-S_050	TB-C47-2						CGCCAACAATTGCCATTACAGCG	13	24	54,2	64,4	126,127
54	Pa-S_051	TB-C47-3						TCCAACAGGCAGGAGTACAGGGTG	13	24	58,3	66,1	128,129

55	Pa-S_052	TB-C47-4	CGCTGCACATACAGGTCCGTCTC	13	24	54,2	64,4	130,131	Abb.18c
56	Biotin + Cy3-marker								
57	Pa-S_081	oriC T-C_wt_1	AGCCCAAGCAATTGGGTGTTCTCCG	1	25	65,6	56		
58	Pa-S_082	oriC T-C_mut_2	AGCCCAAGCAACTGGGTGTTCTCC	1	24	65,1	58		
59	Pa-S_083	alkB2 G-A_wt_2	GCTGGTGGCGGGTGTGC		19	67,4	79	8,9	
60	Pa-S_084	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGCGGTGTGC		21	67,3	67	20,21	
61	Pa-S_085	oprl T-C_wt_2	CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG		27	64,6	56		
62	Pa-S_086	oprl T-C_mut_2	GAAAGCTCAGCAGACCGCTGACGAG		25	64,9	60		
63	Pa-S_087	ampC_1 G-A_wt_2	ACGGCCGGGTGACGCC		19	70,2	84		
		ampC_1 G-							
64	Pa-S_088	A_mut_2	ACGGCCGCCAGGGTGACGCCG		20	69,9	80		
65	Pa-S_089	ampC_3 C-T_wt_1	GCCGACCTACGGCCGGGC		19	68,4	84		
		ampC_3 C-							
66	Pa-S_090	T_mut_2	AGCCGACCTATGGCCGGCA		21	68,4	71		
67	Pa-S_091	ampC_4 G-A_wt_2	GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA		24	65	58		
		ampC_4 G-							
68	Pa-S_092	A_mut_2	GTTCGAACGACTCATGGAGCAGCAAG		26	63,5	54		
69	Pa-S_093	exoS-1_1	CAGCCCAAGTCAAGGAGCCGA		20	64,9	70		
70	Pa-S_094	exoU_1	AGTGAACGTGGTTTCAGCAGTCCC		24	64,8	58		
71	Pa-S_095	47D7-1_1	GTGTCAACGGCCATGCTAGCAGC		24	65	63		
72	Pa-S_096	C-46_1	CGAAGTCTGAGGTGTGGACCCGC		23	64,5	65		
73	Pa-S_097	Fla-Insel-2_ofA	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG		24	64,8	63		
74	Pa-S_098	Fla-Insel-2_ofC	CGTACTCAGCTTCTCACCCAGCG		24	64,3	63		
75	Pa-S_099	Fla-Insel-2_ofI	CCTGGACCTCTCCAAGGTTGCCCT		24	65	63		
76	Pa-S_100	Fla-Insel-2_ofJ	GCCATTCCGACGACCAACAGGC		24	64,2	58		

group "mother"

well- no	tube	name	5'-3'-sequence	group	length	[%]	Tm [°C]	spot- ID's	Abb.19a
1	Pa-S_001	oriC T-C_wt	GAAGCCCCAGCAATTGGCGTTTC	1	23	52,2	62,4	2,3	
2	Pa-S_056	oriC T-C_mut_1	GAAGCCCCAGCAACTGGCGTTTC	1	23	56,5	64,2	14,15	
57	Pa-S_081	oriC T-C_wt_1	AGCCAGCAATTGGCGTTCTCCG	1	25	65,6	56	13,25	
58	Pa-S_082	oriC T-C_mut_2	AGCCAGCAACTGGCGTTCTCC	1	24	65,1	58	37,49	
3	Pa-S_057	oprL T-C_wt_1	GGTGGTGCAGGGCTTCCGGGG	1	23	69,6	69,6	4,5	
4	Pa-S_058	oprL T-C_mut_1	GGTGGTGCAGGGCTTCCGGGG	1	23	73,9	71,3	16,17	
5	Pa-S_059	fliC a A-T_wt_1	CAAGATCGCCGCAGGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	6,7	
6	Pa-S_060	fliC a A-T_mut_1	CAAGATCGCCGCAGGGTCAAC	1	22	63,6	65,8	18,19	
59	Pa-S_083	alkB2 G-A_wt_2	GCTGCTGGGGGTGTGTC	1	19	67,4	79	8,9	
60	Pa-S_084	alkB2 G-A_mut_2	TGCTGCTGGCAGGGGTGTGCT	1	21	67,3	67	20,21	
9	Pa-S_063	alkB2 A-G_wt_1	CCTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG	1	25	72,0	72,8	10,11	
10	Pa-S_064	alkB2 A-G_mut_1	CTCGCCCTGTTCCCACCGCTCTGG	1	24	75,0	73,0	22,23	
11	Pa-S_065	citS A-G_wt_1	TCGAGCAAAC TGGCAGAGAAATCCG	1	24	54,2	64,4	26,27	
12	Pa-S_066	citS A-G_mut_1	CGAGCAAAC TGGGGAGAAATCCG	1	23	60,9	66,0	38,39	
13	Pa-S_067	citS G-C_wt_1	GGGGAAAACCTCCCTGCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	28,29	
14	Pa-S_068	citS G-C_mut_1	GGGGAAAACCTCCCTGCACATGATGTT	1	26	46,2	63,2	40,41	
15	Pa-S_069	oprI T-C_wt_1	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG	1	23	60,9	66,0	30,31	
16	Pa-S_070	oprI T-C_mut_1	AGCTCAGCAGACCCGCTGACGAG	1	22	63,6	65,8	42,43	
61	Pa-S_085	oprI T-C_wt_2	CAGAAAGCTCAGCAGACTGCTGACGAG	1	27	64,6	56	61,73	
62	Pa-S_086	oprI T-C_mut_2	CAGAAAGCTCAGCAGACCCGCTGACGAG	1	25	64,9	60	24,85	
63	Pa-S_087	ampC_1 G-A_wt_2	ACGGCCGGGGTGACGCC	1	19	70,2	84	32,33	
64	Pa-S_088	ampC_1 G-A_mut_2	ACGGCCGGCCAGGTGACGCC	1	20	69,9	80	44,45	
19	Pa-S_019	ampC_2 C-T_wt	GACAAGATGGCCCTCGACGCC	1	22	63,6	65,8	34,35	
20	Pa-S_073	ampC_2 C-T_mut_1	GACAAGATGGCTCTCGACGCC	1	23	60,9	66,0	46,47	
21	Pa-S_021	ampC_3 C-T_wt	AGCCGACCTACGGGGGGCAG	1	22	77,3	71,4	50,51	
22	Pa-S_074	ampC_3 C-T_mut_1	CAGCCGACCTATGGCCGGGCAG	1	23	73,9	71,3	62,63	

Abb. 19b

Pa-S_089	ampC_3 C-T_wt_1	GCCGACCTACGCCGGGC	1	19	68,4	84	36,48	
65	ampC_3 C-T_mut_2	AGCCGACCTATGCCGGGC	1	21	68,4	71	60,72	
66	Pa-S_090	ampC_4 G-A_wt_2	GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA	1	24	65	58	52,53
67	Pa-S_091	ampC_4 G-A_mut_2	GTTCGAACGGCTCATGGAGCAGCA	1	24	63,5	54	64,65
68	Pa-S_092	ampC_5 G-C_wt_1	GTTCGAACGGACTCATGGAGCAGCAAG	1	26	63,5	54	64,65
25	Pa-S_077	ampC_5 G-C_mut_1	TGGAGGCAAGTGTCCCCGGC	1	22	63,6	65,8	54,55
26	Pa-S_078	ampC_5 G-C_mut_1	TGGAGGCAACTGTCCCCGGC	1	22	63,6	65,8	66,67
27	Pa-S_027	ampC_6 T-C_wt	GAACAGACGGTCCACCAACGG	1	24	58,3	66,1	56,57
28	Pa-S_079	ampC_6 T-C_mut_1	ACAAGACGGCTCCACCAACGG	1	23	60,9	66,0	68,69
29	Pa-S_029	ampC_7 C-A_wt	GGGACCTGGCCTGGTGATCCT	1	22	68,2	67,7	58,59
30	Pa-S_080	ampC_7 C-A_mut_1	GGGACCTGGGACTGGTGATCCT	1	22	63,6	65,8	70,71
31	Pa-S_031	fliC_b	GGCGACCAACTGAACTCCAACTTCG	2	24	58,3	66,1	74,75
32	Pa-S_032	fliC_a	GTCGGCTGAACGGCACCTACTTCA	2	23	56,5	64,2	86,87
69	Pa-S_093	exoS-1_1	CAGCCCCAGTCAGGACGGCCA	3	20	64,9	70	76,77
34	Pa-S_034	exoU	CGCCAGTTGAGAACGGAGTCACC	3	24	58,3	66,1	88,89
70	Pa-S_094	exoU_1	AGTGACCGTGCCTTCAGCAGTCCC	3	24	64,8	58	84,96
35	Pa-S_038	C-47-1	GGGGATCTTCTCACTTCATCGG	4	24	54,2	64,4	78,79
71	Pa-S_095	47D7-1_1	GTGTCA CGGCCATGTCTAGCAGC	5	24	65	63	80,81
38	Pa-S_041	47D7-2	GTGACCATGGAATCGGCAGTCGTT	5	24	58,3	66,1	92,93
39	Pa-S_054	C-45	CGAGGAGTTCTGGACCCGGCTTGA	6	24	54,2	64,4	82,83
40	Pa-S_055	C-46	AATAGGACCGGCAAGACGGCATT	6	24	58,3	66,1	94,95
72	Pa-S_096	C-46_1	CGAAGTCTGAGGTGGACCCGGC	6	23	64,5	65	108,120
41	Pa-S_035	C-Inselspez.-4	CGGCCCTTCTCCTCTGGATGTT	7	24	54,2	64,4	98,99
42	Pa-S_036	C-Inselspez.-5	CAGTATGGACTGAATACGGCGACT	9	25	58,3	66,1	110,111
43	Pa-S_037	C-spezifisch-1	GCATCATTCGGCGTCACTCTGGT	8	24	58,3	66,1	122,123
44	Pa-S_044	pKL-3	TCTGAACTCGGGCTATCACCTGGA	9	24	54,2	64,4	100,101
46	Pa-S_046	pKL-11	AGTCATGGGACTGAATACGGCGACT	9	25	52,0	64,6	124,125
47	Pa-S_042	PAGI-1-1	TTCTCGGTGTCGGGGATCTCGG	10	24	58,3	66,1	102,103
48	Pa-S_043	PAGI-1-8	TGGTAGCTCGACGTACTGGCTG	10	24	58,3	66,1	111,115

## Abb. 19c

49	Pa-S_047	<b>SG17M-1</b>	CCCGTTGCTCATAACCGTTCC	11	24	58,3	66,1	104,105
50	Pa-S_048	<b>SG17M-4</b>	AGGGCATTTCTAGGTGACTCAGG	11	24	54,2	64,4	116,117
51	Pa-S_053	<b>fla-Insel-1</b>	ACCTGTGTCGGTGGAGGGTATGTT	12	24	58,3	66,1	106,107
54	Pa-S_051	<b>TB-C47-3</b>	TCCAAACAGGCAGGAGTACAGGGTG	13	24	58,3	66,1	128,129
55	Pa-S_052	<b>TB-C47-4</b>	CGCTGCACATACAGGTCCGTTCTC	13	24	54,2	64,4	130,131
73	Pa-S_097	<b>Fla-Insel-2_orfA</b>	CGCTGGAGGTATGTTCCGCAGG	14	24	64,8	63	90,91
74	Pa-S_098	<b>Fla-Insel-2_orfC</b>	CGTACTCAGCTTCTCCACCCAGCG	14	24	64,3	63	112,113
75	Pa-S_099	<b>Fla-Insel-2_orfI</b>	CCTGGACCTCTCCAAGGTTGGCCT	14	24	65	63	118,119
76	Pa-S_100	<b>Fla-Insel-2_orfJ</b>	GCCATTCCGACGACCAAAACAAGGC	14	24	64,2	58	126,127
56	Biotin + Cy3-marker					1,12,97,121,132		

group "mother"

**Abb.20**

Chip: MHH\_P\_aer\_array2 (12x11 array mit spot-Abstand von 0,19 mm)

56	43	43	46	46	76	76	54	54	55	55	56
	42	42	74	74	48	48	50	50	75	75	72
56	41	41	44	44	47	47	49	49	51	51	72
62	32	32	34	34	73	73	38	38	40	40	70
61	31	31	69	69	35	35	71	71	39	39	70
61	22	22	68	68	26	26	28	28	30	30	66
58	21	21	67	67	25	25	27	27	29	29	66
58	12	12	14	14	16	16	64	64	20	20	65
57	11	11	13	13	15	15	63	63	19	19	65
57	2	2	4	4	6	6	60	60	10	10	62
56	1	1	3	3	5	5	59	59	9	9	56

## Chipbelegung

Markerspot	C-spezifisch-1	pKL-11	Fla-Insel-2 orfJ	TB-C47-3	TB-C47-4	Markerspot
Markerspot	C-Insel spezifisch-5	Fla-Insel-2 orfC	PAGI-1-8	SG17M-4	Fla-Insel-2 orfI	C-46_1
	C-Insel spezifisch-4	pKL-3	PAGI-1-1	SG17M-1	fla-Insel-1	C-46_1
Markerspot	mut_2 oprl T-C	flic A	exoU	Fla-Insel-2 orfA	47D7-2	C-46
	wt_2 oprl T-C	flic B	exoS-1_1	C-47-1	47D7-1_1	C-45
Markerspot	mut_1 ampC_3 C-T	mut_2 ampC_4 G-A	mut_1 ampC_5 G-C	mut_1 ampC_6 T-C	mut_1 ampC_7 C-A	mut_2 ampC_3 C-T
	wt_2 oprl T-C	wt_2 ampC_3 C-T	wt_1 ampC_4 G-A	wt_1 ampC_5 G-C	wt ampC_7 C-A	wt_2 ampC_3 C-T
Markerspot	mut_1 oriC T-C	mut_1 citS G-C	mut_1 oprl T-C	mut_1 ampC_1 G-A	mut_1 ampC_2 C-T	wt_1 ampC_3 C-T
	wt_1 oriC T-C	wt_1 citS G-C	wt_1 oprl T-C	wt_2 ampC_1 G-A	wt ampC_2 C-T	wt_1 ampC_3 C-T
Markerspot	mut_1 oriC T-C	mut_1 oprl T-C	mut_1 flic a A-T	mut_2 alkB2 G-A	mut_1 alkB2 A-G	oprl T-C mut_2
	wt_1 Markerspot	wt_1 oriC T-C	wt_1 flic a A-T	wt_2 alkB2 G-A	wt_1 alkB2 A-G	Markerspot